

Metodutveckling för produktion av fördubblade haploider i stråsäd

Bakgrund

För att det svenska lantbruket ska få tillgång till nya sorter med aktuella egenskaper lika snabbt som sina europeiska konkurrenter är det viktigt att förädlingsmetoder utvecklas, som förkortar tiden från upptäckt av egenskap i lämplig källa eller från det att ett behov uppstår, fram till färdig sort. Att producera fördubblade haploider (DH) är ett snabbt sätt att skapa homozygota linjer i olika växtslag. Det innebär att tiden från införande av en ny egenskap i en gröda fram till färdig sort kan minskas och det är viktigt både odlingstekniskt och konkurrensmässigt.

Cell- och vävnadsodling av enhjärtbladiga växtarter (t.ex. stråsäd och gräs) är betydligt mer problematiskt än cellodling av tvåhjärtbladiga arter (Steward, 1983). Detta gäller också vid produktion av fördubblade haploider. Bildandet av albinoplantor är ett problem vid produktion i stråsäd, men också dålig respons när det gäller embryobildning och skottregeneration i många genotyper av framför allt vete (Careda & Clément, 1999).

I en stor del av vetets genpool kan fortfarande inte ståndar- eller mikrosporodling användas för produktion av fördubblade haploider eftersom flertalet genotyper saknar responsivitet med befintliga metoder. Ett alternativ för att ändå kunna producera fördubblade haploider av dessa genotyper är att göra pollineringar med andra arter, t.ex. majs som inte bildar hybrider med vete. Efter pollineringen elimineras de främmande kromosomerna och kvar blir ett embryo med haploid vetekromosomuppsättning (Laurie & Bennett, 1986).

För att framställa fördubblade haploider i höstvet på Svalöf Weibull har ståndarodling använts under drygt 10 år. Den begränsande faktorn för användning av ståndarodling vid produktion av fördubblade haploider i stor skala är att metoden endast fungerar med en mindre andel av de önskvärda linjerna. Då mikrosporodling i korn har visat sig ge fler gröna plantor än ståndarodling med samma genotyper, är förhoppningen att samma förhållanden ska gälla för vete. Utveckling av en bra metod för mikrosporodling av höstvet är det viktigaste målet för projektet. Som en del i detta har även ett mindre antal ståndarodlingsförsök gjorts.

Vid projektets start användes ståndarodling för produktion av fördubblade haploider i korn. Ett mål var att etablera och utveckla en effektiv metod för odling av isolerade mikrosporer i DH-produktion i korn eftersom denna metod visat sig ge fler gröna plantor än ståndarodling.

Rågvete är en gröda som ökar i betydelse både i Sverige och i övriga Europa. Ett mål med projektet var att överföra och tillämpa kunskaperna i odling av isolerade mikrosporer från höstvet även i rågveteförädling.

Material och metoder

Vete

Artkorsningar

Metoden för produktion av fördubblade haploider från äggceller innebär pollinering med en främmande arts pollen. Den viktigaste pollendonatorn har varit majs (*Zea Mays*), medan Jobs tårar (*Coix lachryma-jobi*) (Mochida & Tsujimoto, 2001) har använts för pollinering i mindre omfattning. I huvudsak höstvet har pollinerats. Dicamba (Laurie & Reymondie, 1991) och

2,4-D (Matzk & Mahn, 1994) har jämförts vid auxinbehandlingen. Olika appliceringsmetoder för auxin har jämförts (injektion i översta internoden, sprayning av ax, doppning av ax respektive kombinationer av dessa).

Inverkan av tidens längd mellan pollinering och embryoräddning på produktionen har studerats (15 – 21 dagar) och 4 olika steriliseringsprotokoll för karyopser med embryon har jämförts. Jämförelse har gjorts mellan att låta senare ax sitta kvar på plantan och självbefruktas efter pollineringen och att klippa bort alla senare ax än de använda till pollineringen. Flera olika genotyper har använts vid dessa undersökningar.

Mikrosporodling

I ståndarodling (Tuvešson et al., 2000) har försök med behandling av ax med övertryck av lustgas genomförts (Kato, 2002). Epibrassinolide har provats som mediatillsats (Yang et al., 1999).

Fem olika protokoll för odling av isolerade mikrosporer i vete har provats (Touraev et al., 1996, Holme et al., 1999, Kumlehn, pers. medd. 1999, Kasha & Simion, 2001, Konzak et al., 2001). Metoden publicerad av Holme et al. (1999) har vidareutvecklats och testats i kombination med lustgas-, syrgas-, colchicin-, ATP-behandling och kombinationer av dessa. Flera genotyper har använts i detta arbete.

Inom projektets ram har drygt 50 höstvetelinjer testats för sin responsivitet i ståndarodling.

Korn

Fyra olika protokoll för odling av isolerade mikrosporer i höst- och vårkorn har testats och jämförts i olika genotyper (Kasha et al., 1997, Jensen pers. medd. 1998, Kumlehn pers. medd. 1998, Li & Devaux, 2001). Drygt hundra vårkornlinjer har screenats med isolerad mikrospor- eller ståndarodling och 17 höstkornsorter har screenats med isolerad mikrosporodling.

Rågvete

Tre rågvetesorter har provats i isolerad mikrosporodling. Protokollet enl. Holme et al., (1999) kompletterat med lustgas- och colchicinbehandling har använts.

DHatabase

En databas, DHatabase, har skapats för att göra alla historiska och nya screeningdata för responsivitet i DH produktion hos olika stråsädesslag tillgängliga och åskådliga för både DH-producenter och växtförädlare. Arbetet har utförts som ett examensarbete på utbildningen till bioinformatiker (Engerberg, 2002).

Resultat

Vete

Artkorsningar

Som pollenproducent var majs överlägsen och är den art som huvudsakligen använts och används i nuvarande produktion. Auxinbehandling med doppning av axen i 60 mg/l 2,4-D-lösning är en effektiv, säker och billig metod.

Den optimala tiden från pollinering till embryoräddning har bestämts till maximalt 18 dagar för att erhålla högst antal plantor per pollinerat ax. Koncentrationen aktivt klor som används vid sterilisering av ax inför embryoräddning har visats kunna dubblas utan reduktion av antalet producerade plantor. När senare utvecklade ax klipptes bort från plantorna förbättrades

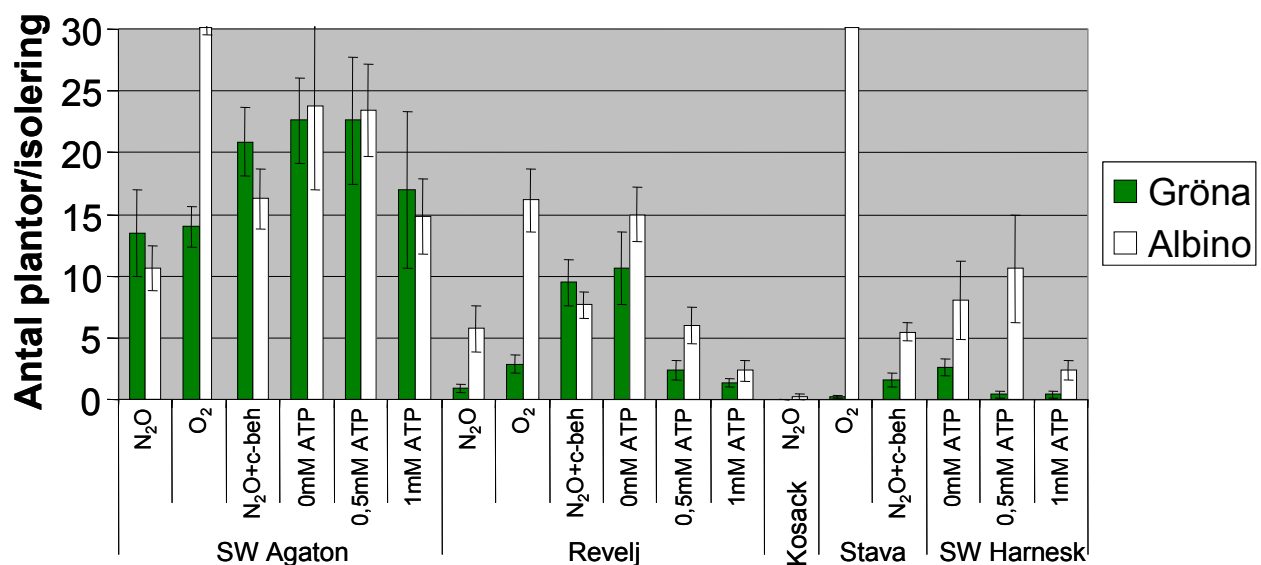
produktionen med 40% jämfört med att låta de senare skotten sitta kvar. Produktionsresultatet har under projektperioden och fram till 2005 års produktion i växtförädlingen kunnat förbättras från i medeltal 1,6 till 7,8 producerade embryon per ax och från 0,2 till 1,9 plantor per ax med hjälp av de erfarenheter och den kunskap som projektet givit.

Mikrosporodling

Lustgasbehandling av ax till ståndarodling ökade produktionen av gröna plantor ca tre gånger. Behandling med epibrassinolide gav däremot inga entydiga resultat.

De väsentligaste resultaten av mikrosporodling är sammanfattade i figur 1.

Mikrosporodling i höstvet



Figur 1. Medelvärden och standardfel för antal producerade gröna- och albinoplantor per mikrosporisorering i sorterna SW Agaton, Revelj, Kosack, Stava och SW Harnesk med mikrosporodlingsmetod enl. Jensen (2002) kompletterad med lustgasbehandling (N₂O), syrgasbehandling (O₂), lustgas- och colchicinbehandling kombinerat (N₂O+c-beh) eller det sistnämnda kombinerat med behandling med olika koncentrationer adenosintrifosfat (0mM, 0,5mM resp. 1mM ATP). Behandlingarna N₂O+c-beh och 0mM ATP är exakt lika.

Ett urval på 252 mikrosporisoreringar av totalt 502 med de mest relevanta resultaten redovisas här. En responsiv sort (SW Agaton), en sort med sämre responsivitet (Revelj) och tre sorter med dålig responsivitet (Kosack, Stava och SW Harnesk) finns med i detta urval. Metoden som har använts vid isoleringarna är ursprungligen utvecklad på KVL (Holme et al. 1999) och senare modifierad av Jensen (2002). Metoden är den som visat sig fungera bäst inom projektet i jämförelse med andra metoder (Touraev et al., 1996, Kumlehn, pers. medd. 1999, Kasha & Simion, 2001, Konzak et al., 2001). Försök har gjorts med lustgas-, syrgas-, lustgas- i kombination med colchicin-, resp. det sistnämnda i kombination med ATP (adenosintrifosfat)-behandling. I den ursprungliga metoden (Jensen 2002) ingår syrgasbehandling, vilket ersatts med lustgas i de övriga försöken. Enbart lustgasbehandling har i stort sett givit oförändrat antal gröna plantor jämfört med syrgasbehandling. Lustgas har däremot givit färre albinoplantor, vilket är positivt eftersom dessa plantor helt saknar klorofyll och inte kan leva utanför *in vitro*-miljön. Lustgas- i kombination med colchicinbehandling är

den metod som varit mest framgångsrik för att erhålla maximalt antal gröna plantor. Tillsats av ATP har inte haft någon märkbar positiv effekt, men detta arbete pågår fortfarande och resultatbilderna kan komma att förändras. De tendenser som noteras är liknande, om än på olika nivåer, för de olika genotyperna som använts. Produktionen från mikrosporisoleringsarna har i medeltal ökat från 1,8 till drygt 20 gröna plantor per isolering genom det arbete som gjorts inom projektet under den tid denna rapport avser. Bestämning av kromosomtalet har gjorts på de producerade plantorna och i de flesta behandlingarna ligger andelen haploider på 60-85% medan frekvensen spontanfördubblade är 15-34%.

Vid screening av responsivitet i ståndarodling av ett femtiotal vetelinjer gav 38% inga gröna plantor, 55% mellan 0,1 och 3 gröna plantor per ax och 8% mer än 3 gröna plantor per ax.

Korn

Av de fyra protokoll som jämförts har två visat sig fungera bättre. Det är dels en kombination av metoden enl. Kasha et al. (1997) och Jensen (pers. medd. 1998) dels metoden enl. Li & Devaux (2001).

Vid screening av knappt 130 korngenotyper visade det sig bl. a. att produktion i vårkorn är betydligt mer problematisk än i höstkorn (tabell 1).

Tabell 1. Screeningresultat i 17 höstkornsorter och 10 vårkornsorter med isolerad mikrosporodling och ett hundratal vårkornlinjer och *Hordeum spontaneum*-korsningar med ståndarodling.

Gröna plantor per ax	0	0,1-3	3-6	>6
17 höstkornsorter	6%	18%	18%	59%
10 vårkornsorter		80%	20%	
Ca 100 vårkornlinjer & <i>H. spontaneum</i> -korsningar	48%	48%	3%	

Rågvete

Av de tre testade rågvetesorterna gav Bogo bäst resultat och hade i medeltal 9,9 gröna plantor och 81,1 albinoplantor per isolering.

DHatabase

Lotus Notes valdes som plattform för databasen för att göra den tillgänglig för alla växtförädlare inom Svalöf Weibull koncernen. Databasen är delad i sektioner för vårkorn, höstkorn, rågvete, höstvetete och vårvete. Basen för höstvetete är den största med data från ca 500 screenade linjer. Arbetet med databasen är redovisat i sin helhet i Malin Engerbergs examensarbete (2002).

Diskussion

Vete

Artkorsning

Under projektet har majspollinering av vete för produktion av fördubblade haploider kunnat etableras på SW laboratoriet. Trots många svårigheter på vägen kan metoden nu användas för rationell produktion. Det är viktigt att temperaturen i växthusen där veteplantorna odlas inte varierar för mycket under dygnet. Optimalt är om variationen är mindre än 5°C och vid närmare 20°C skillnad mellan dag och nattetemperatur försämrar resultatet alltför mycket för att produktionen ska kunna bli tillräckligt effektiv. Insektsangrepp på veteplantorna försämrar resultatet både p.g.a. av sämre regeneration och förluster p.g.a. ökad infektionsfrekvens. Tiden

från pollinering till embryoräddning ska inte överskrida 18 dagar även om antalet embryon per ax ökar något. Vid längre tid minskar regenerationsfrekvensen markant. Groning i mörker är också något som framgångsrikt har tillämpats.

Etableringen av denna metod innebär att alla önskvärda höstvetegenotyper nu kan användas i produktion av fördubblade haploider.

Mikrosporodling

I jämförelsen mellan responsiv sort (SW Agaton), sort med sämre responsivitet (Revelj) och material med dålig responsivitet har tre olika sorter fått representera det sistnämnda (Kosack, Stava och SW Harnesk). Detta beror på en strävan att använda ett sortmaterial som är så aktuellt som möjligt och som speglar genpoolen som metoderna är tänkta att användas i.

I försöken med lustgas- kombinerat med colchicinbehandling var förhoppningen med colchicinbehandling av mikrosporena (300 μ M i 24 h) att en större andel av de regenererade plantorna skulle vara fördubblade haploider direkt vid regenerationen. Så var inte fallet, men däremot påverkades regenerationsfrekvensen positivt.

Även om effektiviteten i mikrosporodling av vete har ökat till elva gånger den produktion som kunde uppnås i början av projektet (från 1,8 till 20 regenererade plantor per isolering), så är ändå resultaten inte tillräckligt bra för att användas i rutinmässig produktion. Även om en responsiv sort som SW Agaton ligger på ca 20 gröna plantor per isolering så har alltför många genotyper, i likhet med SW Harnesk med 2,6 gröna plantor per isolering, för låg responsivitet för att produktion ska vara ekonomiskt försvarbart. Detta visar på behovet och potentialen i fortsatt utveckling av mikrosporodlingsmetoden.

Korn

Under projektet har produktion av fördubblade haploider i höstkorn med odling av isolerade mikrosporer kunnat etableras på ett framgångsrikt sätt. I vårkornproduktionen kvarstår däremot problem med alltför låga regenerationsfrekvenser. Ett fortsatt arbete med utveckling av mikrosporodlingsmetoden för vårkorn är nödvändigt för att tillgodose växtförädlingens behov.

Rågvete

Den metod som givit bäst resultat i höstvete gav inte alls lika bra resultat i de begränsade försök som gjorts i rågvete. Detta visar på att metoder behöver utvecklas separat för de två växtslagen och olika protokoll behöver testas och utvecklas för rågvete på liknande sätt som gjorts i höstvete.

Publikationer

Engerberg M (2002) Development of database support for production of doubled haploids. Master's dissertation i Computer Science på Högskolan i Skövde.
<http://www.ida.his.se/ida/htbin/exjobb/2002/HS-IDA-MD-02-208>

Forsberg J & Hagberg P (2002) Screening of winter barley genotypes with isolated microspore and anther culture. In Current problems and developments in doubled haploid production, Book of abstracts COST Action 851 Working group 1 Technology advancement for gametic embryogenes, May 10-11, 2002, Budapest.

Forsberg J (2004) Embryo rescue after various sterilisation protocols and various times after maize pollination in wheat. In Gametic cells and molecular breeding for crop improvement,

COST Action 851, Working group 3 Molecular breeding September 2004, Tulln. Abstracts.
<http://www.scri.sari.ac.uk/assoc/COST851/Default.htm>

Forsberg J, Ljungberg A & Hagberg P (2004) Doubled haploid production at Svalöf Weibull. In Technology advancement in gametic embryogenesis of recalcitrant genotypes, Book of abstracts COST Action 851 Working group 1 Technology advancement for gametic embryogenesis, November 11-13, 2004, Palermo.
<http://www.scri.sari.ac.uk/assoc/COST851/Default.htm>

Turesson S, Ljungberg A, Johansson N, Karlsson K-E, Suijs LW and Josset J-P (2000) Large-scale production of wheat and triticale haploids through the use of a single anther culture method. *Plant Breed* 119:455-459
<http://www.blackwell-synergy.com/toc/pbr/119/6>

Turesson S, von Post R & Ljungberg A (2003) Wheat anther culture. In Doubled Haploid Production in Crop Plants. Ed. Maluszynski M, Kasha KJ, Forster BP and Szarejko I. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. ISBN 1-4020-1544-5. pp. 71-76
<http://www.iaea.org/programmes/nafa/d2/public/d2-doubled-haploid.html>

DH-laboratoriets verksamhet inklusive metodutvecklingen finansierad av SLF finns beskriven på
<http://www.swseed.se/>

Litteraturförteckning

- Caredda S and Clément C (1999) Androgenesis and albinism in Poaceae: influence of genotype and carbohydrates. In *Anther and Pollen From Biology to Biotechnology*. Ed. Clément C, Pacini E and Audran J-C. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. pp. 211-228
- Holme IB, Olesen A, Hansen NJP and Andersen SB (1999) Anther culture and isolated microspore culture response of wheat lines from northwestern and eastern Europe. *Plant Breed* 118:111-117
- Jensen A (2002) A method of generating fertile plants from isolated microspores. Patent application no. WO 02/01940 A2
- Kasha K and Simion E (2001) Embryogenesis and plant regeneration from microspores. Patent application no. WO 01/41557 A2
- Kasha KJ, Ziauddin A, Cho U-H, Simion E, Petroski R and Cistué L (1997) Anther and microspore cultures of barley and wheat. *Japan J. Genetics* 38:373-380
- Kato A (2002) Chromosome doubling of haploid maize seedlings using nitrous oxide gas at the flower primordial stage. *Plant Breed* 121:370-377
- Konzak C, Polle E, Liu W and Zheng Y (2001) Methods for generating doubled haploid plants. Patent application no. WO 01/14518 A2
- Laurie DA and Bennett MD (1986) Wheat x maize hybridization. *Can. J. Genet. Cytol.* 28:313-316
- Laurie DA and Reymondie S (1991) High frequencies of fertilization and haploid seedling production in crosses between commercial hexaploid wheat varieties and maize. *Plant Breed* 106:182-189
- Li H and Devaux P (2001) Enhancement of microspore culture efficiency of recalcitrant barley genotypes. *Plant Cell Reports* 20:475-481
- Matzk F and Mahn A (1994) Improved techniques for haploid production in wheat using chromosome elimination. *Plant Breed* 113:125-129

- Mochida K and Tsujimoto H (2001) Production of wheat doubled haploids by pollination with Job's tears (*Coix lachryma-jobi* L.). *Journal of Heredity* 92:81-83
- Steward FC (1983) Reflections on aseptic culture. In *Handbook of Plant Cell Culture Vol. 1 Techniques for Propagation and Breeding*. 1 Ed. Evans DA, Sharp WR, Ammirato PV and Yamada Y. Macmillan Publishing Company, New York. pp. 1-10
- Touraev A, Indrianto A, Wratschko I, Vicente O and Heberle-Bors E (1996) Efficient microspore embryogenesis in wheat (*Triticum aestivum* L.) induced by starvation at high temperature. *Sex Plant Reprod* 9:209-215
- Yang J, Qui G, Yang Q, Chen P and Zhou X (1999) Effects of epi-brassinolide and salicylic acid on wheat anther culture. *Plant Physiology Communications* 35:288-289

Personliga meddelanden från:

Dr. Annie Jensen, Pajbjergfonden, Hou, DK-8300 Odder, Danmark.

Dr. Jochen Kumlehn, Universität Hamburg, Institut für Allgemeine Botanik, AMP II, Ohnhorststr. 18, D-22609 Hamburg, Tyskland.