

Möglichkeiten und Perspektiven der "genetischen Manipulation" von Flachs mit Hilfe von sexuellen und asexuellen Züchtungsmethoden

W. FRIEDT, Justus-Liebig-Universität, Giessen, B.R.D

Einleitung : Ziele der Züchtung von Lein oder Flachs

Der Lein oder Flachs (*Linum usitatissimum*) ist eine typische Mehrnutzungspflanze. In Abhängigkeit von ihrer Verwendung sind unterschiedliche Qualitätskriterien als Zuchtziele maßgebend. Während für den Lein als Ölpflanze vor allem Kriterien hinsichtlich der Nutzung des Leinöles eine Rolle spielen, stehen bei der Flachspflanze eine Optimierung der Menge und Qualität des nutzbaren Flachsertrages im Vordergrund. Im folgenden werden aktuelle und zukunftsorientierte Methoden der Züchtung besprochen, die dazu beitragen können, angestrebte Zuchtziele in kürzester Zeit und in möglichst effizienter Weise zu erreichen.

Konventionelle Methoden der Züchtung von Lein oder Flachs

Der Flachs gehört zu den selbstbefruchtenden Pflanzenarten, die Fremdbefruchtungsrate beträgt im allgemeinen weniger als 10%. Daher sind Leinpflanzen normalerweise weitgehend reinerbig (*homozygot*), und in der Flachszüchtung kommen die auch bei anderen Selbstbefruchtern üblichen Züchtungsmethoden zum Einsatz. Dabei wird üblicherweise durch sexuelle Kreuzungen aufgrund genetischer Rekombination eine neue genetische Variation geschaffen, die eine Auslese verbesserter Genotypen erst ermöglicht. Die Selektion verbesserter Pflanzen und Linien (Genotypen) beginnt dabei frühestens in der F₂-Generation. Die unterschiedlichen Spielarten der Selektionsverfahren beinhalten zeitliche und intensitätsmäßige Differenzierungen der Auslese:

1. Bei der **Pedigree-Selektion** wird über eine Reihe von Generationen eine strikte Auslese zwischen und innerhalb Pflanzennachkommenschaft (Linien) durchgeführt, wobei sich der Weg jeder einzelnen der letztendlich erstellten Linien bis zur F₂ zurückverfolgen läßt (Stammbaum-Züchtung). Im Gegensatz dazu wird im Falle
2. der **Ramsch-Methode** zunächst keine Einzelpflanzen-Selektion durchgeführt. Vielmehr werden hier die spaltenden Populationen (Ramsche) über mehrere Generationen als Genotypen Gemisch bis zur weitgehenden Homozygotie weitergeführt. Erst dann erfolgt die Endauswahl der besten Einzelpflanzen bzw. Linien. Da beide Verfahren langwierig sind, das letztgenannte zudem wenig effizient und das erstgenannte außerordentlich aufwendig ist,

hat sich in der Züchtungspraxis als Kompromiß

3. die **Teilrasmethode** durchgesetzt. Hierbei wird zunächst die spaltenden Population in Einzelpflanzennachkommenschaften ("Subpopulationen") zerlegt, die nun ihrerseits über mehrere Generationen ohne stringende Auslese fortgeführt werden. Allerdings kann in Leistungsprüfungen dieser "Subpopulationen" bereits eine Abschätzung wichtiger Eigenschaften einschließlich der Ertragsleistung vorgenommen werden. Bei Vorliegen weitgehender Homozygotie erfolgt die Endauslese der reinerbigen Linien.

In jedem Fall werden die letztendlich vorliegenden, weitgehend uniformen Linien wiederholten, mehrortigen und mehrjährigen Prüfungen unterzogen, bevor sie im Rahmen von amtlichen Prüfungen ihre Praxiseignung (landeskultureller Wert) beweisen müssen.

Dieses Verfahren ist aufwendig und langwierig, und es hat daher in den zurückliegenden Jahrzehnten nicht an Versuchen gefehlt, es abzukürzen und zu vereinfachen. Solche Bemühungen haben zu den verschiedensten Modifikationen der herkömmlichen (konventionellen) Züchtungsmethoden geführt, die heute in der Züchtungspraxis - je nach Einschätzung - in unterschiedlicher Weise Anwendung finden.

Besondere Bedeutung hat dabei die künstliche Mutationsauslösung (Mutagenese; "Mutationszüchtung") erlangt, mit deren Hilfe die Schaffung neuartiger Merkmalsausprägungen möglich ist. Beispielsweise ist es nach künstlicher Mutationsauslösung mit EMS (Ethyl-Methansulfonat) und nachfolgender Selektion gelungen, Mutanten mit partiell reduziertem Anteil an Linolensäure (C18:3) im Samenöl zu isolieren (GREEN und MARSHALL, 1981; NICHTERLEIN et al., 1989 a). Durch Kreuzung verschiedener solcher Mutanten gelang es GREEN (1986) zudem, rekombinierte Linien (Doppelmutanten) mit Linolensäuregehalt von weniger als 5% im Samenöl zu selektieren. Bis heute ist jedoch noch keine Sorte mit entsprechend niedrigem C18:3-Anteil auf dem Markt. Außerdem muß festgestellt werden, daß auch dieses Verfahren außerordentlich zeit- und arbeitsintensiv ist, so daß seine Anwendung wohl nur in speziellen Fällen - wie dem oben geschriebenen - als Alternative in Betracht kommt.

Bezüglich der Verkürzung und Vereinfachung des Zuchtganges werden seit etwa zwei Jahrzehnten große Hoffnungen in die Anwendung verschiedener Biotechniken gesetzt. Die bisherige und erwartete, zukünftige Bedeutung solcher neuen Techniken für die Züchtung von Lein werden im folgenden exemplarisch besprochen.

EINSATZMÖGLICHKEITEN VON BIOTECHNIKEN IN DER LEINZÜCHTUNG

Bei *Linum usitatissimum* können verschiedene Biotechniken erfolgreich angewandt werden. Sie besitzen zwar bis dato noch keine unmittelbare Bedeutung für die praktische Pflanzenzüchtung,

aufgrund der wesentlichen Fortschritte der letzten Jahre dürfte jedoch die Praxisreife bald gegeben sein. Hierbei sind insbesondere folgende Techniken zu nennen (vgl. Abb. 1):

- Antheren- und Mikrosporenkultur
- Embryokultur ("embruo rescue")
- Protoplastenkultur und Gentechnologie

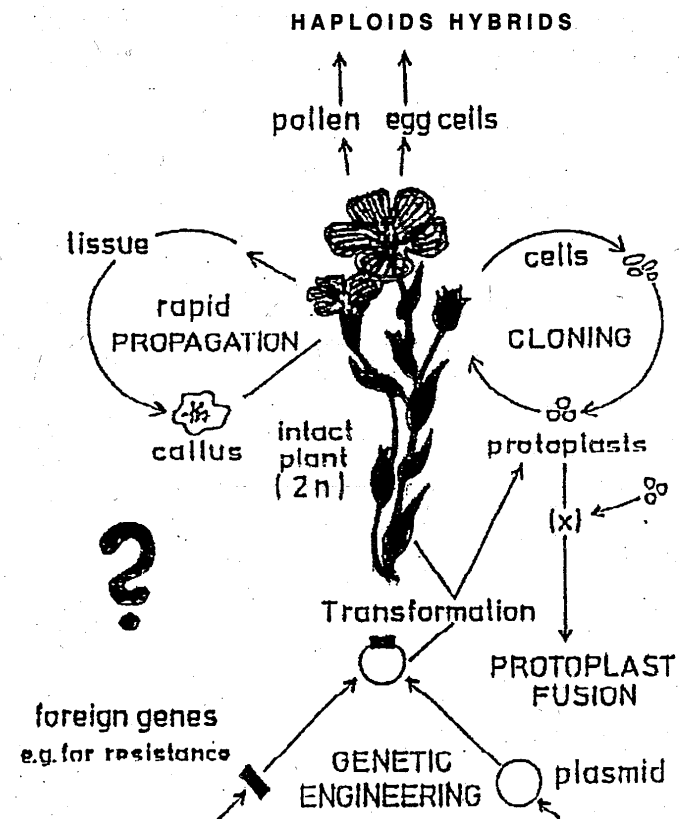


Abb. 1: Übersicht zur Biotechnologie im Hinblick auf Anwendungsmöglichkeiten beim Lein (vgl. FRIEDT, 1990; FRIED UND NICKEL, 1989)

Antheren- und Mikrosporenkultur

Bei diesen Verfahren wird über Regeneration von Pflanzen aus männlichen Gameten (Mikrosporen) versucht, homozygote Linien zu gewinnen. Mikrosporen sind unreife Pollen, die sich durch den einfachen - haploiden - Chromosomensatz auszeichnen. Die haploiden Pflanzen selbst sind steril, aber durch Verdopplung ihres Chromosomensatzes (z. B. mit Hilfe von Colchicin) entstehen fertile diploide Pflanzen - sogenannte Doppelhaploide. Häufig findet auch eine spontane Verdopplung des Chromosomensatzes statt, so daß der aufwendige Arbeitsschritt der Colchicin-Behandlung entfällt. Da die doppelhaploiden Linien (DH-Linien) absolut homozygot sind, können ihre wertgebenden Eigenschaften (Resistenz, Ertrag, Qualität) durch den Züchter sehr genau erfaßt werden, wodurch die Sicherheit und der Erfolg der Selektion wesentlich verbessert werden. Mit der Erstellung von doppelhaploiden Linien aus Kreuzungen agronomisch und qualitativ wertvoller Ölleine kann demnach der Zuchtgang, welcher bei Einsatz konventioneller Züchtungs-Methoden wenigstens 10 - 12 Jahre in Anspruch nimmt, wesentlich verkürzt werden. Zudem können solche homozygoten Linien auch wertvolle Kreuzungspartner darstellen, um Gene für maßgebliche Eigenschaften - wie z. B. Krankheitsresistenz, Salztoleranz, Wuchshöhe - möglichst rasch in bereits vorhandene Sorten einbringen.

Wie bereits von derzeit noch wirtschaftlich bedeutenderen Pflanzenarten - wie z. B. Kruziferen- oder Getreidearten - bekannt ist (vgl. BMELF, 1989), haben verschiedene Faktoren einen wesentlichen Einfluß auf den Erfolg der Kultur haploider Zellen. Zu diesen Faktoren zählen auch beim Lein insbesondere der Genotyp, die Anzuchtbedingungen der Spenderpflanzen und das Nährmedium. Beispielsweise zeigen Vergleiche der Antherenreaktion verschiedener Genotypen auf unterschiedlichen Nährmedien (z.B. variierte Hormonzusammensetzung) deutliche genotypische und medienbedingte Effekte, aber auch Wechselwirkungen zwischen Genotyp und Medium. Diese Ergebnisse bestätigen, daß es sich bei der Gewebekulturtauglichkeit um ein heritables Merkmal handelt, das einer systematischen züchterischen Nutzung durchaus zugänglich ist.

Im Laufe kontinuierlicher Entwicklungsarbeit ist es in den letzten Jahren gelungen, auf der Basis der Antherenkultur ein Haploidensystem zu etablieren, welches die routinemäßige Erstellung doppelhaploider Pflanzen über Antherenkallus ermöglicht (vgl. FRIEDT und UMBACH, 1990; NICHTERLEIN *et al.*, 1989b; 1991; UMBACH UND FRIEDT 1991a; b). Dabei konnten zahlreiche fertile, doppelhaploide Linien aus Kreuzungen (F1) wertvoller Eltern gewonnen werden. Ein Teil der DH-Linien wurde bereits in Feldversuchen vermehrt geprüft. Die festgestellte phänotypische Homogenität dieser DH-Linien ist ein Beleg für ihre Reinerbigkeit, so daß hier unmittelbar Stämme als potentielle Sortenkandidaten vorliegen.

Derzeit laufen weiterführende Versuche zur Entwicklung einer verbesserten Technik für die Kultur isolierter Mikrosporen beim Lein. Eine erfolgreiche Etablierung dieser Methodik hätte in der praktischen Durchführung entscheidende Vorteile gegenüber der Antherenkultur: denn bei der Mikrosporen-Kultur entfällt die zeitaufwendige Präparation der Antheren, da die Knospen der Spenderpflanzen mechanisch aufgeschlossen und dabei die Mikrosporen freigesetzt werden. Jüngste Ergebnisse in dieser Hinsicht zeigen, daß eine Regeneration von Pflanzen auch mit diesem Verfahren möglich ist, so daß die Zukunftsaussichten diesbezüglich positiv bewertet werden können (NICHTERLEIN *et al.*, in Vorbereitung).

Embryokultur ("embryo rescue")

Der Begriff Embryokultur oder "embryo rescue" bezeichnet eine Technik, mit deren Hilfe junge, unreife Embryonen möglichst frühzeitig aus dem Fruchtknoten herauspräpariert und *in vitro* kultiviert werden. Auf diese Weise können Unverträglichkeitsreaktionen ("postzygotische Inkompatibilität"), die ein frühzeitiges Absterben des Embryos zur Folge haben, umgangen und interspezifische Kreuzungen erfolgreich durchgeführt werden. Kreuzungen von Wildarten der Gattung *Linum* mit der Kulturform (interspezifische Bastardisierung) dienen vorrangig einer Erweiterung der Variation - z.B. hinsichtlich des Fettsäuremusters. Außerdem können mit Hilfe solcher Kreuzungen selbstverständlich auch Erbanlagen für andere wertbestimmende Eigenschaften - wie z.B. Krankheitsresistenzen - in das Genom der Kulturart eingebracht werden. Über konventionelle, sexuelle Kreuzungen zwischen *L. usitatissimum* und den Wildformen *L. africanum*, *L. angustifolium*, *L. bienne*, *L. crepitans* und *L. narbonensis* konnte eine Reihe von interspezifischen Hybriden erfolgreich aufgezogen werden (NICHTERLEIN *et al.*, 1989B). Mit Hilfe von "embryo rescue" gelang es darüber hinaus, erstmals Regenerate aus der Kreuzung von Kulturlein mit *L. monogynum* zu gewinnen (NICKEL, 1992). Die Ergebnisse bezüglich der Fettsäurezusammensetzung der Nachkommen solcher interspezifischen Hybriden zeigen, daß Genotypen mit sehr hohem Anteil mehrfach ungesättigter Fettsäuren (Polyenfettsäuren: C18:2, C18:3) gewonnen werden können, deren Ölqualität den Anforderungen für eine Verwertung in der Oleochemischen Industrie schon näher kommt als das bei dem bisher verfügbaren Zuchtmaterial der Fall ist.

Protoplastenkultur und Gentechnik

Allerdings kann die Embryo-Technik grundsätzlich nur in Fällen von postzygotischer Inkompatibilität für eine erfolgreiche Aufzucht von Artbastarden eingesetzt werden. In vielen Kreuzungskombinationen treten jedoch bereits vor der Befruchtung - präzygotisch - Inkompatibilitätsreaktionen auf. Dies gilt insbesondere auch für *Linum*-Arten mit stark differierender Chromosomenzahl. In diesen Fällen kann die Fusion von somatischen Zellen eine weitere Möglichkeit zur Gewinnung interspezifischer Kreuzungen darstellen.

LITERATURHINWEISE

- BARAKAT, M.N. und E.C. COCKING, 1983. Plant regeneration from protoplast derived tissues of *L. usitatissimum* L. Plant Cell Reports 2, 314.
- BARAKAT, M.N. und E.C. COCKING, 1985. An assessment of cultural capabilities of protoplasts of some wild species of *Linum*. Plant Cell Reports 4, 164-167.
- BASIRAN, N.P. ARMITAGE, R.J. SCOTT und J. DRAPER, 1987. Genetic transformation of flax (*Linum usitatissimum*) by *Agrobacterium tumefaciens*: Regeneration of transformed shoots via a callus phase. Plant Cell Reports 6, 396-399.
- BMELF (Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten, Hrsg.), 1989. Biotechnologie in der Agrar- und Ernährungswirtschaft. In: Berichte über Landwirtschaft, 201. Sonderheft, 475 S. Paul Parey, Hamburg Berlin.
- FRIEDT, W., 1990. Qualität und Erweiterung des Artenspektrums. In: Pflanzenproduktion im Wandel (G.HAUG, G. SCHUMACHER und G. FISCHBECK, Hrsg.), 103-122. VCH Weinheim.
- FRIEDT, W. und M. NICKEL, 1989. Zuchtmethodische Ansätze zur Beeinflussung von Pflanzeninhalts- und Speicherstoffen unter besonderer Berücksichtigung von Ölpflanzen. In: Berichte über Landwirtschaft, 201; Sonderheft, 107-121. Verlag Paul Parey, Hamburg und Berlin.
- FRIEDT, W. und H. UMBACH, 1990. Möglichkeiten der Anpassung an die Erfordernisse der Nachfrage bei Öllein. Pflanzliche Öle im chemisch-technischen Sektor, Schriftenreihe des BMELF, Reihe A: Angewandte Wissenschaft, Heft 391, 161-173. Landwirtschaftsverlag Münster-Hiltrup.
- GREEN, A.G., 1986. A mutant genotype of flax (*Linum usitatissimum* L.) containing very low levels of linolenic acid in its seed oil. Can. J. Plant Sci. 66. 499-503.
- GREEN, A.G. and D.R. MARSCHALL, 1981. Variation for oil quantity and quality in linseed (*Linum usitatissimum* L.). Anstr. J. Agric. Res. 32, 599-603.
- JORDAN, M.G. und MCHUGHEN, 1988. Glyphosate tolerant flax plants from *agrobacterim* mediated gene transfer. Plant Cell Reports 7, 281-284.
- HEPBURN, A.G., L.E. CLARKE, K.S. BLUNDY, und J. WHITE, 1983. Nopaline Ti-Plasmid, PTIT37, T-A insertions into a flax genom. J. Mol. Appl. Genet. 2, 211.
- LING, Q. und H. BINDING, 1987. Plant regeneration from protoplasts in *Linum*. Plant Breeding 98, 312-317.
- NICHTERLEIN, K.R. MARQUARD und W. FRIEDT, 1989a. Breeding for modified fatty acid composition by induced mutations in linseed (*Linum usitatissimum* L.). Plant Breeding 101, 190-199.
- NICHTERLEIN, K., M. NICKEL, H. UMBACH, und W. FRIEDT, 1989b. Recent progress and prospects of biotechnology in breeding of linseed (*Linum usitatissimum* L.). Fat Sci.

NICHTERLEIN, K., H. UMBACH and W. FRIEDT, 1991. Genotypic and exogenous factors affecting shoot regeneration from another callus of linseed (*Linum usitatissimum* L.). Euphytica (im Druck).

NICKEL, M., 1992. Versuche zur Erweiterung der genetischen Variation des Fettsäuremusters beim Lein (*Linum usitatissimum* L.) mit Hilfe von Artkreuzungen und *in vitro* Techniken. Diss., Universität Gießen (in Vorbereitung).

UMBACH, H. und W. FRIEDT, 1991a. Züchtung ertragreicher Genotypen des Lein (*Linum usitatissimum* L.) mit verbesserter Samenqualität als Industrierohstoff. In: Schriftenreihe des BMELF, Reihe A; Angewandte Wissenschaft, 397-407. Landwirtschaftsverlag Münster-Hiltrup.

UMBACH, H. und W. FRIEDT, 1991 b. Ergebnisse zur Anwendung der Haploidmethode im Züchtungsgang von Lein (*Linum usitatissimum* L.). Bericht Arbeitstagung der Saatzuchtleiter, Gumpenstein (im Druck).

ZHAN, X., D.A. JONES und A. KERR, 1988. Regeneration of flax plants transformed by *Agrobacterium rhizogenes*. Plant Mol. Biol. 11, 551-559.

Adresse des Autors: Prof. Dr. Wolfgang Friedt, Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung I, Justus-Liebig-Universität, Ludwigstr. 23, D-6300 Giessen.