

# Identifikation von abgeleiteten Sorten bei Mais (*Zea mays* L.) mit molekularen Markern, morphologischen Distanzen und Heterosis – Ein zusammenfassender Vergleich

M. HECKENBERGER, A.E. MELCHINGER, D. KLEIN und M. BOHN

## 1. Einleitung

Die Züchtung einer neuen Pflanzensorte dauert in der Regel 8-10 Jahre und erfordert monetäre Investitionen in Höhe von 1-2 Mio Euro und mehr. Da Pflanzensorten durch Nachbau in der Regel auf einfache Weise reproduziert werden können, bedürfen sie als geistiges Eigentum des jeweiligen Züchters eines besonderen Schutzes, wie er in der UPOV-Konvention (UPOV, 1961) oder in nationalen Sortenschutzrichtlinien, wie etwa dem Deutschen Sortenschutzgesetz verankert ist.

Neben dem bestmöglichen Schutz gegen Plagiatismus und Missbrauch ist es allerdings auch unerlässlich, dass auch geschützte Sorten allen Züchtern als Genressource zur Erzeugung einer genetischen Ausgangsvariation bei der Neuzüchtung von Sorten zur Verfügung stehen. Daher wurde das sog. „Züchterprivileg“, das den Hauptunterschied zwischen Sortenschutz und Patentrecht darstellt, 1978 in die UPOV-Konvention (UPOV, 1978) implementiert.

Durch konventionelle oder neuentwickelte biotechnologische Methoden, wie genetische Transformation von Sorten, fortgesetzte (markergestützte) Rückkreuzung, Selektion von natürlichen oder induzierten Mutanten, Re-Selektion der besten Genotypen innerhalb von bestehenden Sorten oder der Generierung von „kosmetischer“ Variation kann das Züchterprivileg aber gezielt missbraucht werden. Somit ist es möglich, dass der Zuchtfortschritt des Züchters der Ursprungsorte zu wesentlichen Teilen für die Züchtung neuer Sorten ausgenutzt

wird, ohne dass dieser dafür zu entschädigen ist. Die revidierte UPOV-Konvention von 1991 (UPOV, 1991) bezeichnet derartig entwickelte Sorten als sogenannte „im wesentlichen abgeleitete Sorten“ (essentially derived varieties - EDVs) und impliziert, dass im Falle einer wesentlichen Ableitung der Züchter der Ursprungsorte angemessen zu entschädigen ist.

Eine Sorte ist demnach von einer Ausgangssorte („initial variety“) im wesentlichen abgeleitet, wenn sie (1) hauptsächlich aus der Ausgangssorte entwickelt wurde („predominant derivation“), (2) von der Ausgangssorte unterscheidbar sind („clear distinctness“) und (3) genetisch weitestgehend identisch („genetic conformity“) mit der Ausgangssorte ist. Dabei müssen alle drei Kriterien erfüllt sein (ASSINSEL, 1999), um eine Sorte als EDV einzustufen. Während bereits weitestgehend Einigkeit darüber besteht, dass die Entwicklung aus einer Ausgangssorte durch Offenlegung von Zuchtbüchern (GILLILAND et al., 2000) bzw. molekulargenetische Untersuchungen (GILL et al., 1995; GRAHAM et al., 2000) und die Unterscheidbarkeit durch die bewährten UPOV-Registriermerkmale nachzuweisen ist, besteht nach wie vor kein Konsens über die Methoden, die zum Nachweis der genetischen Konformität zweier Sorten anzuwenden sind.

Molekulare Marker, wie „Simple Sequence Repeats“ (SSRs) oder „Amplified Fragment Length Polymorphisms“ (AFLPs) wurden wiederholt zur Identifikation von EDVs vorgeschlagen (ASSINSEL, 1999; BERNARDO and KAH-

LER, 2001; KNAACK et al., 1996; ROLDAN RUIZ et al., 2000; SMITH and SMITH, 1989), da sie einen direkten Schätzwert für das wahre Verwandtschaftsverhältnis zweier Sorten liefern und auch bereits erfolgreich zur Aufklärung der illegalen Verwendung geschützter Maislinien eingesetzt wurden (MARTIN et al., 1991). Neben molekularen Markern wurden aber auch phänotypische Deskriptoren, wie morphologische Merkmale, Kombinationsfähigkeit, oder Heterosis zur Identifikation von abgeleiteten Sorten vorgeschlagen (ASSINSEL, 1999), mit der Argumentation, dass phänotypische Merkmale seit Jahren die Grundlage des Sortenschutzes darstellen und somit auch zur Identifikation von EDVs herangezogen werden sollten (SMITH et al., 1991).

Zudem besteht in allen bedeutenden Kulturarten darunter auch Mais (*Zea mays* L.) nach wie vor Uneinigkeit über akzeptierte und nichtakzeptierte Zuchtverfahren, die zu unabhängigen bzw. abgeleiteten Sorten führen. Insbesondere die Anzahl der erlaubten Rückkreuzungsgenerationen zu einer geschützten Maislinie ist nach wie vor ein Streitpunkt der Züchter und Züchtervereinigungen untereinander. Grenzwerte zur Unterscheidung von unabhängigen und abgeleiteten Sorten wurden deswegen noch nicht festgelegt. Somit ist das Konzept der abgeleiteten Sorten bislang für nahezu alle bedeutenden Kulturarten noch nicht in die Praxis umgesetzt. In Mais ist der wesentliche Grund hierfür, dass bislang kein detaillierter Vergleich aller in Frage kommenden Verfahren stattgefunden hat.

**Autoren:** Dr. Martin. HECKENBERGER, Prof. Dr. A. E. MELCHINGER, Dr. D. KLEIN, Institut für Pflanzenzüchtung, Saatgutforschung und Populationsgenetik, Universität Hohenheim, Fruwirthstr. 21, D-70593 STUTTGART, Email: heckenb@pz.uni-hohenheim.de. Prof. Dr. M. BOHN, Crop Science Department, University of Illinois, S-110 Turner Hall, 1102 South Goodwin Avenue, URBANA, IL-61801, USA.



Hauptziel dieser Studie war daher Brauchbarkeit von molekularen Markern, morphologischen Merkmalen und Heterosis zur Identifizierung von EDVs bei Mais zu untersuchen. Die einzelnen Teilziele waren (1) die Evaluierung von genetischen Distanzen basierend auf SSRs und AFLPs zur Unterscheidung von Maisinzuchtlinien, die aus  $F_2$ -,  $BC_1$ - oder  $BC_2$ - Populationen entwickelt wurden, (2) die Verifizierung von simulierten Daten einer Partnerstudie und (3) der detaillierte Vergleich von molekularen Markern mit morphologischen Merkmalen und Heterosis bezüglich ihrer Eignung zur Identifikation von EDVs und (4) die Erlangung verwertbarer Schlussfolgerungen im Hinblick auf verschiedene Grenzwertszenarien.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Maisinzuchtlinien

Aus den Zuchtprogrammen der Universität Hohenheim, der University of Illinois, sowie fünf kommerziellen europäischen Pflanzenzuchtunternehmen wurden insgesamt 220 europäische und amerikanische Maisinzuchtlinien ausgewählt. Diese ließen sich zu 163 sog. „Tripletts“ kombinieren, die jeweils aus einer Nachkommenlinie (O) sowie beiden Elternlinien ( $P_1$ ,  $P_2$ ) bestanden. Dabei wurden die Nachkommenlinien entweder aus einer  $F_2$ -,  $BC_1$ - oder einer  $BC_2$ - Population entwickelt.

### 2.2 Markeranalysen

Alle Maisinzuchtlinien wurden mit 100 gleichmäßig über das Maisgenom verteilten SSRs genotypisiert. DNA-Isolation, SSR-Analyse, sowie exakte Markerpositionen sind ausführlich bei HECKENBERGER et al. (2002) beschrieben. Entwicklung des SSR-Sets, sowie die SSR-Analyse selbst wurden auf einer kommerziellen Basis von Celera (1756 Picasso Avenue, Davis CA 95616, USA) durchgeführt. Ein Subset aus 104 Maisinzuchtlinien wurde zusätzlich von Keygene N.V. (P.O. Box 216, 6700 AE Wageningen, Niederlande) mit 20 AFLP Primerkombinationen (PCs) genotypisiert, wie ausführlich bei HECKENBERGER et al. (2003b) beschrieben.

### 2.3 Feldversuche

Ein Subset aus 58 europäischen Maisinzuchtlinien aus den Maiszuchtprogram-

men zweier deutscher Züchterfirmen sowie der Universität Hohenheim wurde zusätzlich zur phänotypischen Charakterisierung im Feld ausgewählt. Im Einzelnen bestand das Subset aus 24 Flint und 36 Dentinzuchtlinien, aus denen sich insgesamt 31 Tripletts zusammenstellen ließen. Dabei hatten 21 Tripletts  $F_2$ - und zehn Tripletts  $BC_1$ -abgeleitete Nachkommenlinien. Für die Heterosisuntersuchung wurde für jede Linienkombination innerhalb eines Tripletts ( $P_1 \times P_2$ ,  $P_1 \times O$  and  $P_2 \times O$ )  $F_1$ -Hybridsaatgut erzeugt. Falls von derselben Kreuzung zweier Elternlinien mehr als eine Nachkommenlinie vorhanden war, wurde zusätzlich Hybridsaatgut von jeder möglichen Hybride der Nachkommenlinien untereinander erzeugt. Neben den 58 Linien wurden im Feldversuch insgesamt 114 Intrapool  $F_1$ -Hybriden getestet.

Das Experiment wurde in einem zweijährigen Feldversuch in den Jahren 2000 und 2001 über drei Orte (Bad Krozingen, Eckartsweier and Scherzheim) in der Oberrheinischen Tiefebene in Südwestdeutschland durchgeführt. Die Durchführung im deutschen Hauptanbaugebiet von Körnermais sollte dabei bestmögliche Umweltbedingungen zur Durchführung des Experimentes sicherstellen. Jede Linie und  $F_1$ -Hybride wurde in zwei Wiederholungen pro Ort angebaut, wobei die Versuchsanlage einer vollständig randomisierten Blockanlage entsprach. Insgesamt wurden für die Linien 28 morphologische bzw. agronomische Merkmale nach den UPOV-Richtlinien zum Sortenschutz (Tabelle 1) sowie Midparent-Heterosis für 12 Merkmale erfasst (Tabelle 2).

### 2.4 Biometrische Auswertung

Der Abstammungskoeffizient nach MALÉCOT, (1948) ( $f$ ) wurde zur Berechnung von pedigreebasierten Distanzen verwendet. Dabei ist der  $f$ -Wert der Erwartungswert der genetischen Ähnlichkeit zweier Individuen unter der Annahme, (1) dass alle verwendeten Marker polymorph zwischen den Eltern sind, (2) dass der elterliche Genombeitrag zu den Nachkommen jeweils 50% beträgt und (3) der Abwesenheit von Segregation, Selektion und Drift.

Paarweise genetische Distanzen (GDs) zwischen Maisinzuchtlinien basierend auf SSRs ( $GD_{SSR}$ ) oder AFLPs ( $GD_{AFLP}$ )

wurden unter Verwendung der „Rogers' distance“ (ROGERS, 1972) berechnet. Standardabweichungen (SDs) für genetische Distanzen wurden unter Verwendung einer Jackknife-Prozedur (EFRON, 1982) errechnet. Die wiederholten Stichproben („resampling“) wurden für SSRs über Primerpaare und für AFLPs über Primerkombinationen durchgeführt (FELSENSTEIN, 1985; TIVANG et al., 1994). Um den Effekt von Drift und Selektion auf den elterlichen Genombeitrag abzuschätzen, wurden die experimentellen Daten darüber hinaus mit simulierten Daten verglichen, die in einer Partnerstudie (BOHN et al., 2004) generiert wurden. Das verwendete Modell berücksichtigte dabei lediglich Drift aber keine Selektion oder Mutation. Zur Berechnung von morphologischen Distanzen wurden die Merkmalswerte für jedes Merkmal anhand ihrer phänotypischen Standardabweichung adjustiert, um die Verzerrung zugunsten von Merkmalen mit höheren Werten zu eliminieren. Anschließend wurden für jede paarweise Kombination von Linien Euklidische Distanzen berechnet. Als zweites Distanzmaß wurde die Distanz nach MAHALANOBIS (1936) verwendet, die zusätzlich noch Verzerrungen korrigiert, welche durch Korrelationen von Merkmalen bedingt sind.

Genetische Distanzen, sowie deren Standardabweichungen wurden mit dem Programm PLABSIM berechnet (FRISCH et al., 2000). Die Varianzanalysen der Feldversuche wurden mit PLABSTAT durchgeführt (UTZ, 2001). Alle anderen statistischen Berechnungen wurden mit den Softwarepaketen SAS (SAS Institute, 1988) bzw. R (IHAKA, R. and GENTLEMAN R., 1996) in Verbindung mit einem relationalen Datenbanksystem (HECKENBERGER, et al., 2003a) durchgeführt.

### 2.5 Grenzwertszenarien

Die Häufigkeitsverteilungen für GDs von  $F_2$ -,  $BC_1$ -, und  $BC_2$ - abgeleiteten Maisinzuchtlinien zu ihren Elternlinien wurden mit Betaverteilungen (JOHNSON et al., 1995) separat für jedes Verwandtschaftsverhältnis approximiert. Dabei wurden die Parameter so gewählt, dass Mittelwert und Varianz der ursprünglichen Häufigkeitsverteilung erhalten blieben. Häufigkeitsverteilungen für morphologische Distanzen und Heterosis

**Tabelle 1: Morphologische und agronomische Merkmale, erhoben für 58 Flint- und Dent-Maisinzuchtlinien erhoben in vier oder sechs Umwelten in Süddeutschland.**

Merkmal	Code	UPOV-Code	Umwelten
<b>Kolben</b>			
Durchmesser (mm)	KDI	27	6
Kornzahl je Kolben (No.)	KZK	-/-	6
Kornotyp (1-9 Skala)	KTY	30	4
Anthocyanfärbung der Spindelspelzen (1-9 Skala)	ASP	34	4
Anthocyanfärbung der Narbenfäden (1-9 Skala)	ANF	17	4
Farbe der Kornrückseite (1-9 Skala)	FKR	32	4
Farbe der Kornkrone (1-9 Skala)	FKK	31	4
Kolbenlänge (mm)	KLG	26	6
Anzahl der Komreihen (No.)	KRZ	29	6
Tage bis zum Erscheinen der Narbenfäden (No.)	BTW	15	4
<b>Korn</b>			
Tausendkorngewicht (g)	TKG	-/-	6
Kornertrag (Mg*ha <sup>-1</sup> )	KER	-/-	6
Korngewicht von 4 handgeernteten Kolben (g)	G4E	-/-	6
<b>Blatt</b>			
Winkel zwischen Stängel und Blatt (1-9 Skala)	BLW	3	4
Blatthaltung (1-9 Skala)	BLH	4	4
Blattbreite (mm)	BBR	24	4
<b>Pflanze</b>			
Kolbenansatzhöhe (cm)	KAH	-/-	4
Pflanzenlänge (cm)	PLG	22	6
<b>Rispe</b>			
Anthocyanfärbung der Basis der Hüllspelze (1-9 Sk.)	ABH	8	4
Anthocyanfärbung der Hüllspelze ohne Basis (1-9 Sk.)	AEB	9	4
Länge der Rispenseitenäste 1. Ordnung (cm)	LSA	21	4
Winkel zwischen Hauptast und Seitenästen (1-9 Skala)	RIW	12	4
Anthocyanfärbung der Antheren (1-9 Skala)	AAH	10	4
Haltung der Seitenäste (1-9 Skala)	RIH	13	4
Länge der Rispenhauptachse oberhalb des untersten Seitenastes (cm)	RLU	19	4
Länge der Rispenhauptachse oberhalb des obersten Seitenastes (cm)	RLO	20	4
Anzahl der primären Seitenäste	ASA	14	4
Zeitpunkt der männlichen Blüte	BTM	7	4

**Tabelle 2: Adjustierte Mittelwerte und Spannweiten für relative mid-parent Heterosis (MPH) bezüglich morphologischen and agronomischen Merkmalen von 114 Flint- und Denthhybriden sowie deren Elternlinien und Korrelationen (r) von MPH mit dem Abstammungskoeffizienten (1-f), genetischen Distanzen basierend auf 100 SSRs (GD<sub>SSR</sub>) oder 20 AFLP Primerkombinationen (GD<sub>AFLP</sub>), euklidischen (MD<sub>EUC</sub>) oder Mahalanobis (MD<sub>MAH</sub>) morphologischen Distanzen.**

Merkmal <sup>†</sup>	MPH			1-f	GD <sub>SSR</sub>	r	GD <sub>AFLP</sub>	MD <sub>EUC</sub>	MD <sub>MAH</sub>
	Mittel	Min.	Max.						
KDI	0,09	0,01	0,18	0,68**	0,78**	0,76**	0,65**	0,55**	
KZK	0,59	0,03	1,34	0,76**	0,86**	0,87**	0,69**	0,60**	
KLG	0,25	0,02	0,53	0,78**	0,85**	0,89**	0,68**	0,63**	
KRZ	0,06	-0,02	0,16	0,38**	0,56**	0,50**	0,43**	0,39**	
BTW	-0,06	-0,17	0,03	-0,70**	-0,66**	-0,70**	-0,58**	-0,51**	
TKG	0,10	-0,04	0,42	0,66**	0,71**	0,76**	0,55**	0,53**	
KER	0,79	0,14	2,14	0,73**	0,84**	0,86**	0,72**	0,61**	
G4E	0,75	0,06	1,84	0,80**	0,90**	0,92**	0,66**	0,63**	
KAH	0,27	0,01	0,63	0,75**	0,78**	0,80**	0,58**	0,57**	
PLG	0,17	0,01	0,36	0,75**	0,85**	0,87**	0,63**	0,55**	
BTM	-0,05	-0,17	0,04	-0,59**	-0,76**	-0,74**	-0,49**	-0,42**	

\*,\*\* signifikant für  $p < 0,05$  bzw.  $p < 0,01$

<sup>†</sup> s. Tabelle 1 für Abkürzungen

wurden durch Normalverteilungen approximiert.

Unter der vorläufigen Annahme dass eine F<sub>2</sub>-abgeleitete Linie eine unabhängige Sorte (IDV) ist, eine BC<sub>1</sub>-abgeleitete Linie jedoch eine EDV wurden anschließend basierend auf diesen Verteilungen die Fehler 1. Art ( $\alpha$ ) und Fehler 2. Art ( $\beta$ ) berechnet. Dabei stellt  $\alpha$  die Wahrscheinlichkeit dar, dass eine IDV fälschlicherweise als EDV identifiziert wird, während  $\beta$  die Wahrscheinlichkeit bestimmt, dass eine abgeleitete Sorte nicht als solche erkannt wird (*Abbildung 1*). Ebenso wurden verschiedene Grenzwertszenarien untersucht unter der Annahme, dass eine BC<sub>1</sub>-abgeleitete Linie eine IDV ist, eine BC<sub>2</sub>-abgeleitete Linie jedoch eine EDV.

In der Literatur wurden SSR- bzw. RFLP-basierte GD-Werte von 0,25 (SMITH and SMITH, 1989), 0,20 (ASSINSEL, 2000), 0,15 (LEIPERT, 2003, persönliche Mitteilung) und 0,10 (TROYER and ROCHEFORD, 2002) als potentielle Grenzwerte zur Unterscheidung von unabhängigen und abgeleiteten Sorten vorgeschlagen. AFLP-basierte Grenzwerte wurden anhand der mittleren GD zwischen unverwandten Linien entsprechend adjustiert, um dem geringeren Polymorphiegrad von AFLPs gegenüber SSRs oder RFLPs Rechnung zu tragen. Dabei wurden für alle Grenzwerte die entsprechenden Werte für  $\alpha$  und  $\beta$  berechnet. Zusätzlich wurden auch Grenzwerte auf der Basis von  $\alpha=0,05$  oder  $\alpha=\beta$  für GDs, morphologische Distanzen und Heterosis untersucht.

### 3. Ergebnisse und Diskussion

#### 3.1 Allgemeine Markerdaten

Insgesamt wurden 1099 SSR-Allele, sowie 1077 polymorphe AFLP-Banden identifiziert. Die mittlere Allelzahl pro SSR betrug dabei 11,0 bei einer Spanne von 3 bis 26 Banden je SSR-Marker. Der 'polymorphic information content' (PIC) variierte von 0,10 bis 0,88 für SSRs bei einem Mittelwert von 0,71 und von 0,02 bis 0,50 bei einem Mittelwert von 0,33 für AFLPs. Die Anzahl der polymorphen Banden pro AFLP-Primerkombination variierte von 40 bis 70 bei einem Mittelwert von 53,9. Der Polymorphiegrad der SSRs war aufgrund der breiten genetischen Basis des untersuchten Materials

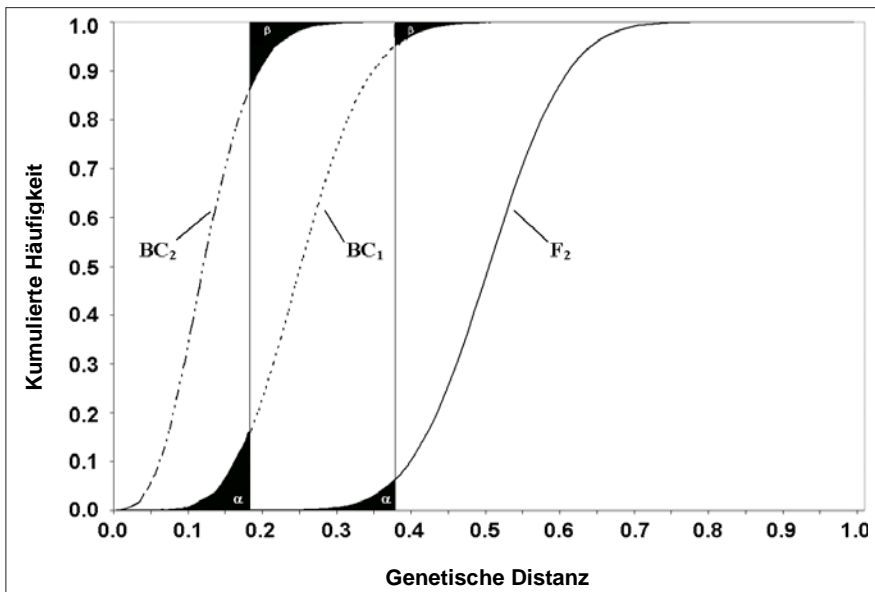


Abbildung 1: Kumulative Häufigkeitsverteilungen für GDs zwischen F<sub>2</sub>-, BC<sub>1</sub>- und BC<sub>2</sub>-abgeleitete Nachkommenlinien zu ihren Eltern (Beispiel).

mit europäischen und US-amerikanischen Maisinzuchtlinien höher, als bisher von verschiedenen Autoren publiziert (SMITH et al., 1997; SMITH and SENIOR, 2000). Da keine amerikanischen Linien mit AFLPs genotypisiert wurden, lag der Polymorphiegrad der AFLPs in etwa im Rahmen der bisher veröffentlichten Diversitätsstudien über europäische Flint- und Dentinzuchtlinien (LÜBERSTEDT et al., 2000; VUYLSTEKE et al., 2000).

### 3.2 Morphologische und Agronomische Merkmale

Schätzwerte für genotypische Varianzen ( $\hat{\sigma}_g^2$ ) waren, gepoolt über Flint- und Dentlinien, signifikant ( $p < 0,01$ ) für alle Merkmale. Ebenso wurden, aufgrund der feuchten und kühlen Witterung im Jahr 2000 im Gegensatz zum heißen, trockenen Wetter 2001, für die meisten Merkmale signifikante Genotyp x Umwelt - Interaktionsvarianzen ( $\hat{\sigma}_{ge}^2$ ) festgestellt. In den allermeisten Fällen war jedoch wesentlich geringer als  $\hat{\sigma}_g^2$ . Die Schätzwerte für  $\hat{\sigma}_g^2$  stimmten dabei im wesentlichen mit einer früheren Studie von BAR-HEN et al. (1995) überein, die 974 Maisinzuchtlinien mit RFLPs und morphologischen Merkmalen untersuchten. Bezüglich der relativen Midparent-Heterosis (MPH) wurden ebenfalls für die meisten Merkmale signifikante genotypische Varianzen gefunden. Jedoch wur-

den beträchtliche Unterschiede im Ausmaß der Heterosis zwischen den Merkmalen festgestellt, wobei die höchsten Werte für KER, G4K, KZK und PLG gefunden wurden. Heritabilitäten für Heterosiswerte variierten von 0,66 bis 0,97 und waren dabei generell geringfügig niedriger als für *per se* Leistung.

### 3.3 Zusammenhang zwischen Marker- und Felddaten

Die Standardabweichungen für GDs bewegten sich zwischen 0,00 und 0,06 für SSRs und zwischen 0,00 und 0,02 für AFLPs bei einem Mittelwert von 0,04 für SSRs und 0,01 für AFLPs. Dabei waren die Standardabweichungen für SSRs signifikant größer als für AFLPs und waren für gegebene GD-Werte grundsätzlich breiter gestreut. Die genetischen Distanzen zwischen unverwandten Inzuchtlinien basierend auf SSRs variierten von 0,25 bis 0,85 für Dent- sowie von 0,23 bis 0,79 für Flintlinien, bei einem

Mittelwert von 0,61 bzw. 0,58. Basierend auf AFLPs variierten die GDs zwischen unverwandten Dentlinien von 0,11 bis 0,41 und zwischen unverwandten Flintlinien von 0,19 bis 0,36 bei einem Mittelwert von 0,31 für Dent- und 0,30 für Flintlinien. Für unverwandte Eltern der US-Introgressionslinien betrug die mittlere GD 0,74 basierend auf SSRs bei einer Spannweite von 0,22 bis 0,93. Die Differenzen zwischen den mittleren GDs waren für alle Pools und Markersysteme signifikant voneinander verschieden.

Die Korrelationen zwischen GD und  $1-f$  waren hochsignifikant für alle Pools und Markersysteme, aber tendenziell für Dentlinien höher als für Flintlinien. Die Korrelationen zwischen genetischen und morphologischen Distanzen waren nur mäßig, wobei die Korrelationen für Flintlinien generell höher waren als für Dentlinien (Tabelle 3). Euklidische Distanzen waren dabei mäßig,  $MD_{MAH}$  nur schwach mit dem Abstammungskoeffizienten korreliert, sind also nur ein sehr vages Bild der Verwandtschaftsverhältnisse zwischen den Linien. Beide Beziehungen zeigten dabei eine „dreieckige“ Form, da geringe GDs zwischen zwei Maisinzuchtlinien zwar generell geringen MDs entsprechen, hohe GDs aber entweder mit hohen oder mit niedrigen MDs assoziiert sind („Doppelgängerphänomen“). Diese „Dreiecksbeziehung“ wurde bereits in mehreren Studien bestätigt (DILLMANN et al., 1997; REBOURG et al., 1999; van EEUWIJK and BARIL, 2001) und lässt sich auch biologisch erklären (BURSTIN and CHARCOSSET, 1997; NUEL et al., 2001).

Im Gegensatz dazu waren die Beziehungen zwischen MPH und GDs bzw.  $1-f$  linear, wobei die Korrelationen hochsignifikant ( $p < 0,01$ ) und generell höher waren, als die Korrelationen von MDs

Tabelle 3. Korrelationen zwischen dem Abstammungskoeffizienten ( $1-f$ ), genetischen Distanzen basierend auf 100 SSRs ( $GD_{SSR}$ ) und 20 AFLP Primerkombinationen ( $GD_{AFLP}$ ) sowie euklidische ( $MD_{EUC}$ ) und Mahalanobis ( $MD_{MAH}$ ) morphologische Distanzen basierend auf 25 Merkmalen für 12 Flint-Triplets (unterhalb der Diagonalen) und 26 Dent-Triplets (oberhalb der Diagonalen).

	$1-f$	$GD_{SSR}$	$GD_{AFLP}$	$MD_{EUC}$	$MD_{MAH}$
$1-f$		0,75**	0,85**	0,58**	0,31**
$GD_{SSR}$	0,88**		0,92**	0,57**	0,40**
$GD_{AFLP}$	0,88**	0,97**		0,68**	0,40**
$MD_{EUC}$	0,55**	0,65**	0,65**		0,62**
$MD_{MAH}$	0,44**	0,49**	0,59**	0,76**	

\*\* Signifikant für  $p < 0,01$ .

**Table 4: Vergleich verschiedener Grenzwertszenarien basierend auf morphologischen Distanzen, Heterosis und genetischen Distanzen basiert auf SSRs und AFLPs.**

Merkmal	$F_2$ vs. $BC_1$				$BC_1$ vs. $BC_2$			
	$\alpha = 0.05$	$\beta$	$\alpha = \beta$	$\alpha = \beta$	$\alpha = 0.05$	$\beta$	$\alpha = \beta$	$\alpha = \beta$
<b>Morphologische Distanzen</b>								
Euklidische ( $MD_{EUC}$ )	4.0	0.82	5.8	0.32	3.1	0.60	4.1	0.21
Mahalanobis ( $MD_{MAH}$ )	22.5	0.97	38.5	0.39	24.5	0.40	31.0	0.28
<b>Heterosis</b>								
Korntrag (G4E)	0.24	0.95	0.58	0.39	0.24	0.53	0.41	0.25
Pflanzenlänge (PLG)	0.08	0.71	0.13	0.31	0.03	0.70	0.08	0.29
Kornzahl/Kolben (KZK)	0.17	0.98	0.48	0.47	0.22	0.52	0.36	0.24
Kumulativ <sup>†</sup>	0.14	0.93	0.29	0.38	0.13	0.51	0.21	0.25
<b>Genetische Distanzen</b>								
100 SSRs ( $GD_{SSR}$ )	0.21	0.32	0.25	0.14	0.08	0.38	0.12	0.18
20 AFLP Primerkomb. ( $GD_{AFLP}$ )	0.12	0.35	0.14	0.21	0.04	0.37	0.05	0.10

<sup>†</sup> Durchschnittliche relative Heterosis der fünf Merkmale (G4E, KLG, KZK, PLG, KAH) die am engsten mit 1-f korreliert waren.

mit GDs bzw. 1-f (Tabelle 2). Diese Korrelationen waren dabei höher, als von AJMONE MARSAN et al. (1998) publiziert aber ähnlich den von BOPPEN-MAIER et al. (1993) und SMITH et al. (1990) vorgestellten Ergebnissen.

### 3.4 Evaluierung von EDV-Grenzwertszenarien

Beobachtete Häufigkeitsverteilungen von GDs für  $F_2$ -,  $BC_1$ -, und  $BC_2$ -abge-

leitete Nachkommenlinien entsprachen den approximierten Betaverteilungen in hohem Maße, sowohl für Flint- als auch für Dentlinien. Für beide Genpools wurden dabei beträchtliche Überlappungen zwischen den Verteilungen gefunden.

Innerhalb der Generationen war dabei die mittlere GD zwischen Eltern- und Nachkommenlinie für Dentlinien signifikant höher als für Flintlinien.

Bei einem gegebenen Fehler 1. Art ( $\alpha$ ) von 0.05 für  $F_2$ -abgeleitete Linien, beträgt der Fehler 2. Art ( $\beta$ ) 0.23, bzw. 0.37 für die ermittelten Grenzwerte von Flint- bzw. Dentlinien. Damit würden 77% der  $BC_1$ -abgeleiteten Flint- und 63% der  $BC_1$ -abgeleiteten Dentlinien korrekt als EDVs identifiziert (Tabelle 4). Unter der Annahme, dass eine  $BC_1$ -abgeleitete Linie eine unabhängige Sorte wäre, eine  $BC_2$ -abgeleitete Linie jedoch eine EDV, wären die entsprechenden  $\beta$ -Werte niedriger als bei der Unterscheidung von  $F_2$ - und  $BC_1$ -abgeleiteten Linien. Die Vorgabe, die Fehler 1. und 2. Art auszubalancieren ( $\alpha = \beta$ ) führte zu niedrigeren  $\beta$ -, aber höheren  $\alpha$ -Werten als bei einem fixen  $\alpha$  von 0,05.

Für die vorgeschlagenen Grenzwerte von  $GD = 0,25, 0,20$  und  $0,15$  variierten die  $\alpha$ -Werte für  $F_2$ -abgeleitete Linien zwischen 0,18 und 0,00 bei  $\beta$ -Werten zwischen 0,08 und 0,93. Für  $GD = 0,15$  und  $0,10$  variierten die  $\alpha$ -Werte für  $BC_1$ -abgeleitete Linien zwischen 0,02 und 0,07 bei  $\beta$ -Werten zwischen 0,01 und 0,90. Generell wurden für  $\alpha$  und  $\beta$  beträchtliche Differenzen zwischen Flint-, Dent- und Introgressionslinien (genaue Beschreibung bei HECKENBERGER et al. (2004) sowie zwischen SSRs und AFLPs gefunden, was die Einführung von genpool- und markersystemspezifischen Grenzwerten erforderlich macht.

Grenzwerte basierend auf Heterosis oder morphologischen Distanzen erwiesen sich hingegen als nur bedingt zur Identifikation von EDVs geeignet, da für diese Methoden wesentlich höhere  $\alpha$ - und  $\beta$ -Fehler beobachtet wurden, als für molekulare Marker (Tabelle 5).

**Table 4: Evaluierung verschiedener Grenzwertszenarien basierend auf experimentellen und simulierten Daten für SSRs und AFLPs.**

Szenario	Dent				Flint			
	SSR		AFLP		SSR		AFLP	
	exp. <sup>†</sup>	sim. <sup>‡</sup>	exp.	sim.	exp.	sim.	exp.	sim.
$\alpha = 0,05$ ( $F_2$ vs. $BC_1$ )								
T	0,24	0,18	0,12	0,09	0,21	0,17	0,10	0,10
$\beta$	0,37	0,29	0,30	0,31	0,23	0,28	0,25	0,13
$\alpha = 0,05$ ( $BC_1$ vs. $BC_2$ )								
T	0,12	0,07	0,04	0,04	0,09	0,07	0,02	0,04
$\beta$	0,60	0,50	0,65	0,50	0,40	0,45	0,65	0,39
$\alpha = b$ ( $F_2$ vs. $BC_1$ )								
T	0,28	0,22	0,14	0,11	0,24	0,20	0,12	0,11
$\alpha = \beta$	0,17	0,14	0,17	0,15	0,12	0,12	0,18	0,08
$\alpha = b$ ( $BC_1$ vs. $BC_2$ )								
T	0,16	0,10	0,06	0,05	0,11	0,10	0,02	0,05
$\alpha = \beta$	0,18	0,18	0,20	0,18	0,11	0,20	0,17	0,13
ASTA ( $0,25_{SSR}$ , $0,13_{AFLP}$ ) ( $F_2$ vs. $BC_1$ )								
$\alpha$	0,07	0,26	0,08	0,28	0,18	0,30	0,22	0,23
$\beta$	0,32	0,05	0,24	0,04	0,08	0,02	0,15	0,01
ASSINSEL ( $0,20_{SSR}$ , $0,10_{AFLP}$ ) ( $F_2$ vs. $BC_1$ )								
$\alpha$	0,01	0,09	0,01	0,11	0,03	0,11	0,06	0,04
$\beta$	0,61	0,19	0,43	0,20	0,28	0,13	0,25	0,15
Troyer ( $0,10_{SSR}$ , $0,05_{AFLP}$ ) ( $BC_1$ vs. $BC_2$ )								
$\alpha$	0,02	0,00	0,12	0,00	0,07	0,00	0,36	0,00
$\beta$	0,84	0,82	0,38	0,83	0,25	0,80	0,05	0,87

<sup>†</sup> Grenzwertberechnung basierend auf experimentellen Daten

<sup>‡</sup> Grenzwertberechnung basierend auf simulierten Daten

#### 4. Literatur

- AJMONE MARSAN, P., P. CASTIGLIONI, F. FUSARI, M. KUIPER and M. MOTTO, 1998: Genetic diversity and its relationship to hybrid performance in maize as revealed by RFLP and AFLP markers. *Theor. Appl. Genet.* 96:219-227.
- ASSINSEL, 1999: Essential Derivation and Dependence. Practical Information.
- ASSINSEL, 2000: DUS testing: Phenotype vs. Genotype. ASSINSEL, Position Paper adopted at the Rome Congress in May 2000.
- BAR-HEN, A., A. CHARCOSSET, M. BOUGOIN and J. GUIARD, 1995: Relationship between genetic markers and morphological traits in a maize inbred lines collection. *Euphytica*. 84:145-154.
- BERNARDO, R. and A. L. KAHLER, 2001: North American Study on Essential Derivation in Maize: Inbreds Developed Without and With Selection From F-2 Populations. *Theoretical and Applied Genetics*. 102:986-992.
- BOHN, M., M. HECKENBERGER, M. FRISCH and A. E. MELCHINGER, 2004: A statistical framework for identification of essentially derived varieties obtained from biparental crosses of homozygous lines. *Statistical theory*. In Preparation.
- BOPPENMAIER, J., A. E. MELCHINGER, G. SEITZ, H. H. GEIGER and R. G. HERRMANN, 1993: Genetic diversity for RFLPs in European maize inbreds. III. Performance of crosses within versus between heterotic groups for grain traits. *Plant-breed*. 111:217-226.
- BURSTIN, J. and A. CHARCOSSET, 1997: Relationship between phenotypic and marker distances: theoretical and experimental investigations. *Heredity*. 79:477-483.
- DILLMANN, C., A. BAR-HEN, D. GUERIN, A. CHARCOSSET and A. MURIGNEUX, 1997: Comparison of RFLP and morphological distances between maize (*Zea mays* L.) inbred lines - consequences for germplasm protection purposes. *Theor. Appl. Genet.* 95:92-102.
- EFRON, B., 1982: The bootstrap, the jackknife, and other resampling plans. S.I.A.M., Philadelphia.
- FELSENSTEIN, J., 1985: Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*. 39:783-791.
- FRISCH, M., M. BOHN and A. E. MELCHINGER, 2000: PlabSim: Software for simulation of marker-assisted backcrossing. *J. Hered.* 91:86-87.
- GILL, P., C. P. KIMPTON, A. URQUHART, N. OLDROYD, E. S. MILLICAN, S. K. WATSON and T. J. DOWNES, 1995: Automated short tandem repeat (STR) analysis in forensic casework: a strategy for the future. *Electrophoresis*. 16:1543-1552.
- GILLILAND, T. J., R. COLL, E. CALSYN, M. de LOOSE, M. J. T. v. EIJK and I. ROLDAN RUIZ, 2000: Estimating genetic conformity between related ryegrass (*Lolium*) varieties. I. Morphology and biochemical characterisation. *Mol-breed*. 6:569-580.
- GRAHAM, J., J. CURRAN and B. S. WEIR, 2000: Conditional Genotypic Probabilities for Microsatellite Loci. *Genetics*. 155:1973-1980.
- HECKENBERGER, M., M. BOHN and A. E. MELCHINGER, 2004: A statistical framework for identification of essentially derived varieties obtained from biparental crosses of homozygous lines. I. SSR data from maize inbreds. *crop sci* submitted.
- HECKENBERGER, M., M. BOHN, J. S. ZIEGLE, L. K. JOE, J. D. HAUSER, M. HUTTON and A. E. MELCHINGER, 2002: Variation of DNA fingerprints among accessions within maize inbred lines and implications for identification of essentially derived varieties. I. Genetic and technical sources of variation in SSR data. *Mol. Breed*. 10:181-191.
- HECKENBERGER, M., A. E. MELCHINGER and M. FRISCH, 2003a: Verwendung von Datenbanken in der Pflanzenzüchtung am Beispiel MS Access. Bericht über die 53. Tagung der Vereinigung der Pflanzenzüchter und Saatgutkaufleute Österreichs 2002, Gumpenstein. 47-53.
- HECKENBERGER, M., J. ROUPPE van der VOORT, A. E. MELCHINGER, J. PELEMAN and M. BOHN, 2003b: Variation of DNA fingerprints among accessions within maize inbred lines and implications for identification of essentially derived varieties. II. Genetic and technical sources of variation in AFLP data and comparison to SSR data. *Mol Breed*. 12:97-106.
- IHAKA R. and R. GENTLEMAN, 1996: A Language for Data Analysis and Graphics. *Journal of Computational and Graphical Statistics*. 5:299-314.
- JOHNSON, N. L., S. KOTZ and N. BALAKRISHNAN, 1995: Continuous Univariate Distributions Vol.2. p. 210-275. In J. Wiley and Sons, Inc., New York.
- KNAAK, C., J. FÖRSTER and M. JÄGER-GUSSEN, 1996: „Abgeleitete“ Sorten aus praktischer Sicht (in German). Bericht über die 47. Arbeitstagung 1996 der Saatzuchtler im Rahmen der „Vereinigung österreichischer Pflanzenzüchter“ BAL Gumpenstein. 167-172.
- LÜBBERSTEDT, T., A. E. MELCHINGER, C. DUSSLE, M. VUYLSTEKE and M. KUIPER, 2000: Relationships among early european maize inbreds: iv. Genetic diversity revealed with aflp markers and comparison with rflp, rapid, and pedigree data. *Crop Sci*. 40:783-791.
- MAHALANOBIS, P. C., 1936: On the generalized distance in statistics. *Proc. Natl. Acad. Sci. India*. 2:49-45.
- MALÉCOT, G., 1948: *Les mathématiques de l'hérédité*. Masson & Cies, Paris.
- MARTIN, J. M., T. K. BLAKE and E. A. HOCKETT, 1991: Diversity among North American spring barley cultivars based on coefficients of parentage. *Crop Sci*. 31:1131-1137.
- NUEL, G., S. ROBIN and C.P. BARIL, 2001: Predicting distance using a linear model: the case of varietal distinctness. *Journal of Applied Statistics*. 28:607-621.
- REBOURG, C., P. DUBREUIL and A. CHARCOSSET, 1999: Genetic Diversity Among Maize Populations: Bulk Rflp Analysis of 65 Accessions. *Maydica*. 44:237-249.
- ROGERS, J. S., 1972: Measures of genetic similarity and genetic distance. *Studies in Genet VII. Univ. Texas Publ.* 7213:145-153.
- ROLDAN RUIZ, I., F. A. v. EEUWIJK, T. J. GILLILAND, P. DUBREUIL, C. DILLMANN, J. LALLEMAND, M. de LOOSE and C. P. BARIL, 2000: A comparative study of molecular and morphological methods of describing relationships between perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) varieties. *Theor-appl-genet*. 103:1138-1150.
- SAS Institute, 1988: SAS/STAT User's Guide, Release 6.03 edn. SAS. Cary.
- SMITH, J. S. C., E. C. L. CHIN, H. SHU, O. S. SMITH, S. J. WALL, M. L. SENIOR, S. E. MITCHELL, S. KRESOVICH and J. ZIEGLE, 1997: An evaluation of the utility of SSR loci as molecular markers in maize (*Zea mays* L.) - comparisons with data from RFLPs and pedigree. *Theor. Appl. Genet.* 95:163-173.
- SMITH, J. S. C. and M. L. SENIOR, 2000: The utility of simple sequence repeat (SSR) data to preferentially identify progeny lines of maize (*Zea mays* L.) that are bred from known inbred parents. *Maydica*. 45:205-213.
- SMITH, J. S. C. and O. S. SMITH, 1989: The description and assessment of distances between inbred lines of maize: II. The utility of morphological, biochemical and genetic descriptors and a scheme for testing of distinctiveness between inbred lines. *Maydica*. 34:151-161.
- SMITH, J. S. C., O. S. SMITH, S. L. BOWEN, R. A. TENBORG, and S. J. WALL, 1991: The description and assessment of distances between inbred lines of maize. III. A revised scheme for the testing of distinctiveness between inbred lines utilizing DNA RFLPs. *Maydica*. 36:213-226.
- SMITH, O. S., J. S. C. SMITH, S. L. BOWEN, R. A. TENBORG and S. J. WALL, 1990: Similarities among a group of elite maize inbreds as measured by pedigree, F1 grain yield, grain yield, heterosis, and RFLPs. *Theor. Appl. Genet.* 80:833-840.
- TIVANG, J. G., J. NIENHUIS and O. S. SMITH, 1994: Estimation of sampling variance of molecular marker data using the bootstrap procedure. *Theoretical & Applied Genetics*. 89:259-264.
- TROYER, A. F. and T. R. ROCHEFORD, 2002: Germplasm Ownership: Related Corn Inbreds. *Crop Sci*.42:3-11.
- UPOV, 1961: International convention for the protection of new varieties of plants.
- UPOV, 1978: International convention for the protection of new varieties of plants.
- UPOV, 1991: International convention for the protection of new varieties of plants.
- UTZ, H. F., 2001: Plabstat, ein Computerprogramm zur statistischen Analyse von pflanzenzüchterischen Experimenten, Version 2P vom 14. Juli 2001 (in German). Universität Hohenheim, Germany.
- Van EEUWIJK, F. A. and C. P. BARIL, 2001: Conceptual and statistical issues related to the use of molecular markers for distinctness and essential derivation. *Acta Hort*. 546:35-53.
- VUYLSTEKE, M., R. MANK, B. BRUGMANS, P. STAM, and M. KUIPER, 2000: Further characterization of AFLP (r) data as a tool in genetic diversity assessments among maize (*zea mays* L.) Inbred lines. *Mol. Breed*. 6:265-276.