

# Untersuchungen zur Züchtung auf Kühletoleranz bei Mais

K. WILDE, T. PRESTERL, E.M. MÖLLER, M. OUZUNOVA, W. SCHMIDT und H.H. GEIGER

## 1. Einleitung

Als tropische Pflanze reagiert Mais (*Zea mays* L.) sensitiv auf kühle Witterungsbedingungen (DIEPENBROCK et al. 2005). Die optimalen Temperaturen liegen bei 25 bis 30°C. Bei Temperaturen unter 20°C ist das Wachstum gehemmt; bei Temperaturen unter 6°C können irreparable Schäden auftreten, die teilweise sogar zum Absterben der Pflanze führen können (GREAVES 1996). Während der Kornfüllungsphase bewirken kühle Temperaturen Ertragsverluste, bei Silagemais eine Reifeverzögerung und einen geringeren Energiegehalt (FREI 2000). Um diesen negativen Auswirkungen zu begegnen, ist die Entwicklung von kühletoleranten Maissorten in Mitteleuropa ein wichtiges Zuchtziel. Da kühletolerante Maissorten den Boden schneller abdecken, verringern sie zudem Erosionen und Nitratauswaschungen.

In der Literatur liegen zahlreiche Berichte über Untersuchungen zur Kühletoleranz bei Mais vor. Diese lassen sich wie folgt unterteilen: (i) physiologische und genetische Charakterisierung (ii) Untersuchungen zur genetischen Variabilität (Screening) und (iii) züchterische Verbesserung des Merkmals. Als physiologische Parameter wurden zum Beispiel die Keimfähigkeit (BROOKING 1990, ZEMETRA und CUANY 1991) und verschiedene Photosyntheseparameter (LEIPNER et al. 1999, DUCRUET et al. 2005, HUND et al. 2005) in direktem Zusammenhang mit Kühletoleranz gebracht. Kühletoleranz ist ein quantitativ variierendes Komplexmerkmal mit polygenischer Vererbung (MARYAM und JONES 1983, HODGES et al. 1997). Die Detektion von QTL (quantitative trait loci) für Kühletoleranz gelang FRACHEBOUD et al. (2002), JOMPUK (2004) und HUND et al. (2004). In allen drei Studien standen Photosyntheseparameter im Vordergrund der Studien. Genetische Variabilität für Kühletole-

ranz ist sowohl in adaptiertem als auch in exotischem Mais vorhanden (EAGLES und BROOKING 1981, BROOKING 1990, FRACHEBOUD et al. 1999, BRANDOLINI et al. 2000) und wird seit langem züchterisch genutzt. Bereits 1954 veröffentlichte ANDREW einen Artikel: „Breeding maize for cold resistance“. In diesem berichtet er über die kühletolerante Population ‚Golden Glow‘, die 1922 in Wisconsin (USA) zugelassen wurde und mittels Frühausaat entwickelt wurde. Auch MOCK und BAKRI (1976) demonstrierten an US Maiszuchtmaterial eine Verbesserung der Kühletoleranz im adaptierten Genpool mittels rekurrenter Selektion. FRACHEBOUD et al. (1999) erreichten eine höhere Kühletoleranz in Flint und Dent-Zuchtpopulationen durch indirekte Selektion auf geringe Chlorophyll-Fluoreszenz.

Die hier vorgestellte Studie befasst sich mit der klassischen Rückkreuzungsmethode (RINKE und SENTZ 1961) im Vergleich der mit DNA-Markern möglichen Identifizierung und Nutzung vorteilhafter Genloci (QTL = quantitative trait loci). Dabei wird unter Kühletoleranz eine rasche Jugendentwicklung trotz kühler Witterung verstanden, die mittels Frischmassebeerntung quantifiziert wird. Es wurden QTL-Allele für Kühletoleranz von Mais aus dem Andenhochland in

Elitezuchtmaterial transferiert und in verschiedenen Generationen und Kreuzungskombinationen untersucht. Zur Schätzung der QTL wurde eine Kartierungspopulation aus aktuellem Zuchtmaterial verwendet und Leistungsprüfungen in elf Umwelten unterzogen. Zur Verifikation der QTL wurden zum einen nahe isogene Linien (NILs) erstellt und auf ihre Kühletoleranz geprüft. Zum anderen wurden die Effekte der QTL in einer rekombinierten DH-Linienpopulation ermittelt.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Quantifizierung der Kühletoleranz

Kühletoleranz wurde anhand der Frischmasseleistung im Jugendstadium erfasst. Dazu wurde der oberirdische Teil der Pflanzen kurz vor der Schossphase geerntet. Der Anbau der Pflanzen erfolgte an Orten, an denen regelmäßig Kühle auftrat.

### 2.2 Einlagerung exotischer Ressourcen

Das verwendete exotische Donormaterial stammt aus dem Andenhochland (Tabelle 1, CML-350 etc.). Es wurde 1999 mit zwei adaptierten, kühesensitiven Eliteeltern (SL und D2) gekreuzt und mehrfach zu dem jeweiligen Elter rück-

**Tabelle 1: Materialumfang der einzelnen Kreuzungskombinationen in den Leistungsprüfungen 2001-2004**

Kreuzungskombination	BC2S1	BC2S2	BC3DH
	2001 Linien	2002 Linien	2004 Linien bzw. Testkreuzungen
D2xCML-350	90	10	3
D2xCML-352	88	10	4
D2xCML-353	103	10	8
D2xCML-355	99	10	48
D2xCML-356	88	10	5
SLxCML-350	109	10	14
SLxCML-352	105	10	38
SLxCML-353	103	11	18
SLxCML-354	102	10	18
SLxCML-355	99	12	49
SLxCML-356	86	10	6

**Autoren:** Dr. Katinka WILDE, Prof. Dr. Hartwig H. GEIGER, Institut für Pflanzenzüchtung, Saatgutforschung und Populationsgenetik (350), D-70593 STUTTGART, Evelyn M. MÖLLER, Milena OUZUNOVA, Walter SCHMIDT und Thomas PRESTERL, KWS Saat AG, D-37574 EINBECK



gekreuzt. Aus der zweiten Rückkreuzungsgeneration (BC2) wurden durch Selbstung BC2S1- und BC2S2-Linien entwickelt. Selektierte BC3-Linien dienten zudem als Donoren zur Erstellung doppelhaploider Linien (BC3DH-Linien). Die Auswahl der BC2S2- und BC3-Linien basierte auf Prüfergebnissen der BC2S1-Linien. Bei letzteren wurde nicht nur die Linieneigenleistung, sondern auch die Testkreuzungsleistung erfasst. Die BC2S1-Linien wurden 2001 an zwei Orten (Walldorf bei Heidelberg und Einbeck bei Göttingen) und die BC2S2-Linien 2002 an fünf Orten (Einbeck, Walldorf, Hohenheim bei Stuttgart, Oberer Lindenhof/Schwäbische Alb, Lönigen bei Oldenburg) auf Frischmasseleistung geprüft. Die Prüfung der BC3DH-Linien erfolgte 2004 an drei Orten (Einbeck, Oberer Lindenhof und Chartres/Frankreich). Als Tester wurde für die D2-Kreuzungskombinationen die kühelesensitive Elitelinie SL und für die SL-Kreuzungskombinationen ein anderer kühelesensitiver Dent-Tester (Walter SCHMIDT, mündliche Mitteilung) verwendet. An den Orten Hohenheim, Eckartsweier und Oberer Lindenhof betrug die Parzellengröße 3 m<sup>2</sup>, an den restlichen deutschen Standorten 4,5 m<sup>2</sup> und an den französischen Standorten 4,88 m<sup>2</sup>. Die Parzellen waren einreihig. Die pflanzenbaulichen Maßnahmen wurden ortsüblich durchgeführt.

Alle Leistungsprüfungen der BC1 wurden als Zweisatzgitter angelegt. Der Materialumfang geht aus *Tabelle 1* hervor. In BC1S1 waren die Prüfglieder zufällig auf 19 Gitter, in BC2S2 auf ein Gitter verteilt. Die BC3DH-Linien bzw. -Testkreuzungen wurde als drei Zweisatzgitter und einem unwiederholten Gitter geprüft.

### 2.3 QTL-Analyse im Elitezuchtmaterial

Die Kartierungspopulation bestand aus 720 DH-Linien, die aus der Kreuzung zwischen einer kühelesensitiven (SL) und einer kühetoleranten (TH) Linie stammten. Beide Eltern gehören dem Dent-Pool an. Daher wurde für den Test auf Kombinationsfähigkeit ein Flint-Tester verwendet. In die Kartierung der Frischmasse-QTL für Linieneigenleistung gingen 691 und in die für Testkreuzungsleistung 688 Genotypen ein. Die phänotypischen

Daten wurden in insgesamt elf Umwelten (Ort/Jahr-Kombinationen) erhoben. Im Jahr 2001 erfolgte der Anbau der Genotypen an vier deutschen (Einbeck, Oberer Lindenhof, Walldorf und Eckartsweier bei Kehl) und an zwei französischen Orten (Arras und Tournois). Im Jahr 2002 wurde die Prüfung nur in Deutschland an den Orten Einbeck, Oberer Lindenhof, Walldorf, Hohenheim und Lönigen durchgeführt. An den Orten Hohenheim, Eckartsweier und Oberer Lindenhof betrug die Parzellengröße 3 m<sup>2</sup>, an den restlichen deutschen Standorten 4,5 m<sup>2</sup> und an den französischen Standorten 4,88 m<sup>2</sup>. Die Parzellen waren einreihig. Die pflanzenbaulichen Maßnahmen wurden ortsüblich durchgeführt. Die Leistungsprüfungen wurden als acht unwiederholte Gitter angelegt.

Für die Genotypisierung wurden 188 polymorphe Mikrosatellitenmarker eingesetzt. Die gewonnenen Daten wurden mit dem Computerprogramm Joinmap (VAN OOIJEN und VOORRIPS 2001) zu einer genetischen Karte verrechnet (Daten werden nicht gezeigt). Die QTL-Schätzung erfolgte mit dem Programmpaket PLABQTL (UTZ und MELCHINGER 1996), wobei die Methode des „composite interval mapping“ angewendet wurde. Als Signifikanzschwelle wurde ein LOD-Wert von 3,0 festgelegt.

Zur Verifikation der QTL wurden zum einen nahe isogene Linien (NILs) entwickelt. Diese stammten von DH-Linien und wurden mehrmals zum kühelesensitiven Elter (SL) rückgekreuzt. Anschließende Selbstung und markerbasierte Selektion gewährleistete Homozygotie der gewünschten QTL-Region in einem kühelesensitiven Hintergrund. Die NILs wurden 2005 als 7x7 Zweisatzgitter an vier Orten (Einbeck, Hohenheim, Oberer Lindenhof und Chartres) geprüft.

Zum anderen erfolgte die Verifikation der QTL mittels markergestützter Selektion (MAS). Aus der Kartierungspopulation wurden die zehn aussichtsreichsten Linien nach einem diallelen Kreuzungsplan rekombiniert. Von jeder der 45 Kreuzungen wurden 5 - 8 DH-Linien, insgesamt 340, entwickelt und davon 189 Linien im Jahr 2004 und 2005 vierortig (Einbeck, Oberer Lindenhof, Hohenheim und Chartres) auf ihre Frischmasseleistung geprüft. Hierbei

wurde nicht nur die Linieneigenleistung, sondern auch die Testkreuzungsleistung erfasst. Die Prüfung erfolgte in zwei 10x10 Zweisatzgittern.

### 2.4. Statistische Verrechnung der Felddaten

Die Leistungsprüfungsdaten wurden mit dem Programmpaket PLABSTAT (UTZ 2000) verrechnet. Unwiederholte Versuche wurden mit der Prozedur „UNREP“ in PLABSTAT analysiert, wobei eine Adjustierung der Parzellenwerte durch Einbeziehung der vier umliegenden Nachbarparzellen erfolgte. Aufgrund unterschiedlicher Parzellengrößen wurden die Frischmasseerträge immer auf die Einzelpflanze bezogen. Zur Vermeidung von Skaleneffekten aufgrund stark schwankender Versuchsmittelwerte wurden die Einzelpflanzenenerträge in Prozent des jeweiligen Versuchsmittelwertes umgerechnet.

## 3. Ergebnisse

### 3.1 Nutzung exotischer Ressourcen

Die exotischen Linien zeigten eine deutliche Differenzierung hinsichtlich ihrer Eigenleistung (*Abbildung 1*), allerdings war nur die Linie CML-355 in der Frischmasseleistung signifikant höher als die kühelesensitiven Eltern. Die Linie CML-350 war in ihrer Frischmasseleistung signifikant schlechter als SL und D2. Dagegen differenzierten die BC2S1-Kreuzungskombinationen in ihrer Frischmasseleistung kaum.

Die Kreuzungskombinationen mit SL erzielten im Durchschnitt 8 % höhere Frischmasseerträge als die Kombinationen mit D2 (*Tabelle 2*). Insgesamt war eine hohe Streuung innerhalb der Kreuzungskombinationen zu beobachten. Die Kreuzungskombinationen mit CML-355 waren in der BC2S2-Prüfung den anderen Kreuzungskombinationen deutlich überlegen. Dies zeigt sich im hohen Anteil dieser Kreuzungskombination innerhalb der 20 % besten BC2S2-Linien (*Abbildung 2*). Bei einem anderen Donor, der Linie CML-350, lag die Eigenleistung zwar deutlich unter der Eigenleistung der übrigen Donoren (*Abbildung 1*), die BC2S2-Linien erreichten aber dennoch dasselbe Leistungsniveau wie die Nachkommen der anderen Donoren und

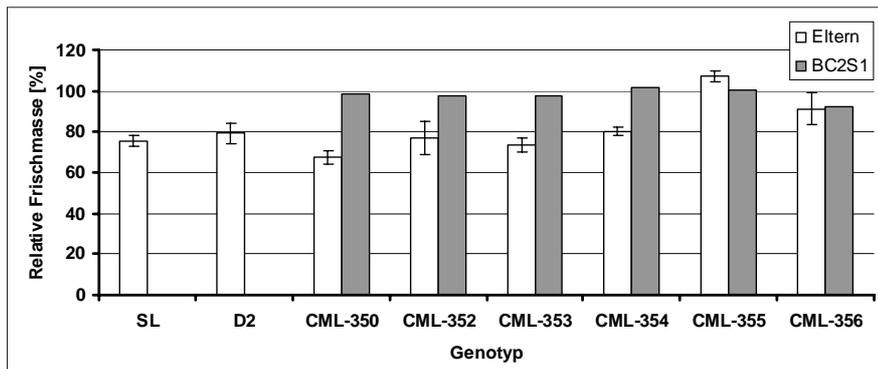


Abbildung 1: Relative Frischmasse der Kreuzungskombinationen und der exotischen Elternlinien. Die Intervallsymbole (I) zeigen den Standardfehler an. Der Anbau erfolgte an zwei Orten im Jahr 2001.

Tabelle 2: Linieneigenleistung mit Standardfehler (SE) bzw. genetische Spannweite der Elternlinien und der BC2S1-Linien. Der Anbau erfolgte an zwei Orten im Jahr 2001

	Elternlinien		BC2S1-Linien			
	Mittel	SE	Rekurrenter Elter: SL		Rekurrenter Elter: D2	
			Mittel	Spannweite	Mittel	Spannweite
D2	79,4	2,61	-	-	-	-
SL	75,7	5,09	-	-	-	-
CML-350	67,3	3,20	102,7	59,7 - 143,6	94,8	43,2 - 155,4
CML-352	76,9	8,29	102,5	67,5 - 141,4	93,3	54,4 - 149,8
CML-353	73,6	3,20	102,1	64,0 - 152,3	93,3	43,6 - 136,3
CML-354	80,1	2,22	101,7	70,2 - 206,7	-	-
CML-355	107,1	2,66	103,6	66,9 - 153,7	97,3	66,9 - 153,7
CML-356	91,2	7,81	95,0	52,9 - 136,3	89,8	52,9 - 136,3

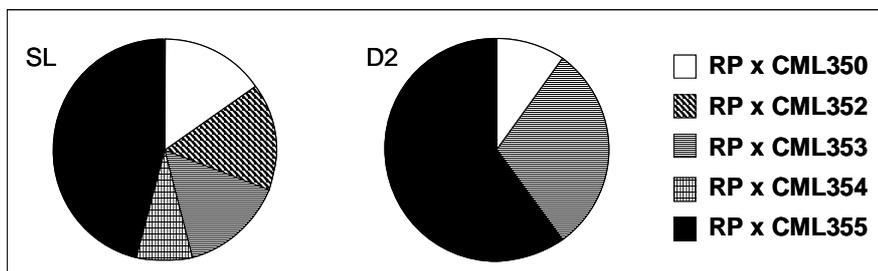


Abbildung 2: Prozentuale Verteilung der BC2S2-Linien unterschieden nach SL- und D2-Kreuzungskombinationen innerhalb der 20 % besten Genotypen. Der Anbau erfolgte an fünf Orten im Jahr 2002.

waren auch mit beträchtlichen Anteilen unter den 20 % besten BC2S2-Linien vertreten (Abbildung 2).

Die BC3DH-Linien zeigten eine große Spannweite in ihrer Frischmasseleistung (Abbildung 3). Sowohl bei den SL- als auch bei den D2-Kreuzungskombinationen gab es Linien, die deutlich besser als ihre kühesensitiven Eltern waren.

Die Testkreuzungen der BC3DH-Linien zeigten eine ähnlich große Leistungsvariation wie die Linien *per se* (Abbildung 4). Die mittleren Kreuzungsleistungen der Kombinationen mit SL und D2 unterschieden sich nur geringfügig. Es

bestand keine Korrelation zwischen Linien- und Testkreuzungsleistung.

### 3.2 QTL-Analyse im Elitezuchtmaterial

#### 3.2.1 QTL-Detektion

Es konnten sieben QTL für Frischmasseleistung der Linien und zehn für die der Testkreuzungen detektiert werden (Abbildung 5). Die QTL für Linienleistung erklären gemeinsam 77 % der phänotypischen Varianz, während die QTL für Testkreuzungsleistung nur 46,6 % erklären. Ein QTL für Linienleistung und vier für Testkreuzungsleistung stammen

vom kühesensitiven Elter. Der wichtigste QTL liegt auf Chromosom 4 und erklärt 33,5 % der phänotypischen Varianz. Sowohl auf Chromosom 4 als auch auf Chromosom 5 konnten auf Linienniveau QTL detektiert werden, die sich auf Testkreuzungsniveau bestätigten. Allerdings erklärten diese QTL auf Testkreuzungsniveau einen wesentlich geringeren Teil der Varianz als auf Linienniveau.

#### 3.2.2 Verifikation der QTL-Effekte in NIL-Prüfungen

Für die QTL auf den Chromosomen 4, 5, 6 und 8 wurden jeweils mehrere NILs erstellt. Zur sprachlichen Vereinfachung werden nachfolgend die von dem kühetoleranten Elter stammenden DNA-Sequenzen der betreffenden QTL-Bereiche (kurz: QTL-Allele) mit QTL4, QTL5, QTL6 bzw. QTL8 bezeichnet, wobei die ersten drei sich positiv auf die Kühletoleranz der Linien *per se* und QTL4 sowie QTL8 auf die der Testkreuzungen auswirkte (Abbildung 5).

Im Mittel erhöhte QTL4 die Frischmasseleistungen signifikant stärker als die anderen QTL (Abbildung 6). Bemerkenswerterweise führte bei der Linienleistung auch QTL8 zu einem positiven Effekt, obwohl dieser QTL nur bei der Testkreuzungsanalyse detektiert worden war. Beide Eltern der Kartierungspopulation lagen in der Frischmasseleistung unter dem Niveau der NILs.

#### 3.2.3 Verifikation der QTL-Effekte in einer rekombinierten DH-Linienpopulation

Unter den 189 Prüfgliedern der rekombinierten DH-Linienpopulation befanden sich jeweils mehrere, die 0, 1, 2, 3, 4, 5 oder 6 positive QTL-Allele trugen (Abbildung 7). Die Korrelation zwischen der Frischmasseleistung und der Anzahl positiver QTL im Genom einer DH-Linie war mäßig straff ( $r = 0,46^{**}$ ). Die entsprechende lineare Regression zeigte, dass ein QTL-Allel im Durchschnitt eine Erhöhung des relativen Frischmasseertrags um 4,2 % bewirkte.

## 4. Diskussion

In dieser Studie wurden zwei Strategien untersucht, um kühetolerante Maislinien zu erhalten. Zum einen wurde die

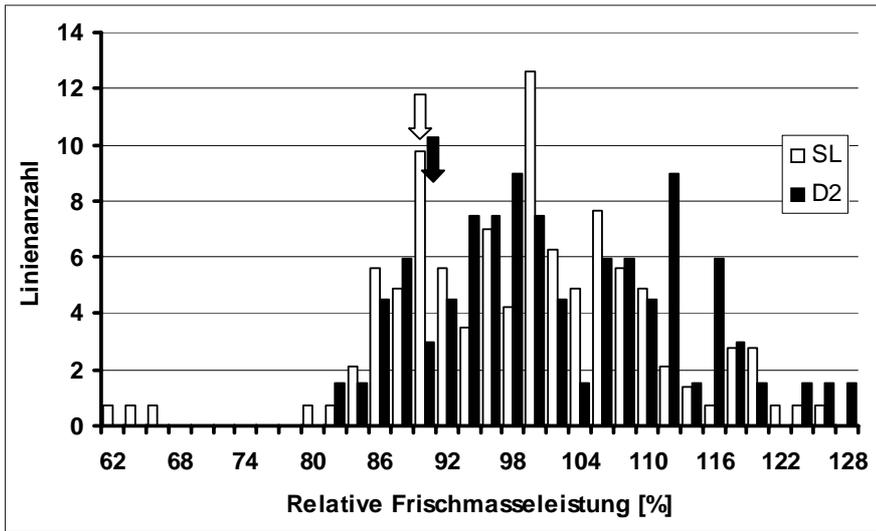


Abbildung 3: Häufigkeitsverteilung der relativen Frischmasseleistung der BC3DH-Linien unterschieden nach SL- und D2-Kreuzungskombinationen. Die Pfeile kennzeichnen die Leistung der beiden kühesensitiven, rekurrenten Eltern. Der Anbau erfolgte an drei Orten im Jahr 2004.

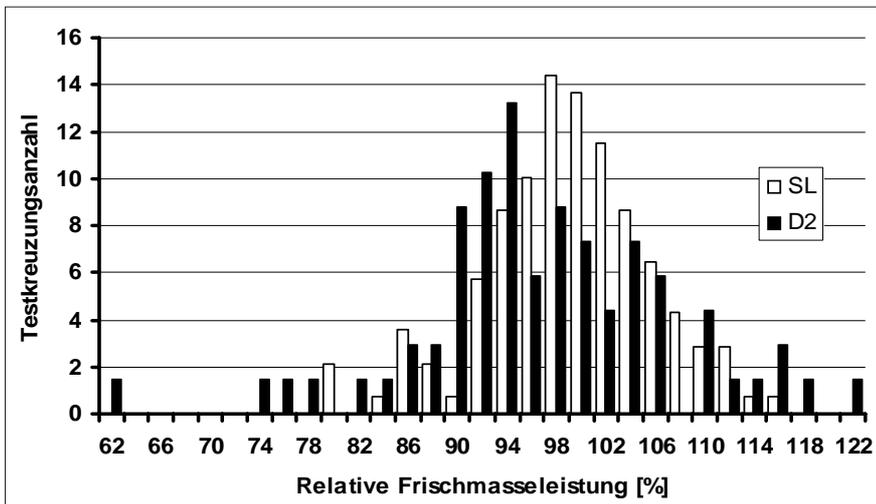


Abbildung 4: Häufigkeitsverteilung der Testkreuzungsleistung der BC3DH-Linien unterschieden nach SL- und D2-Kreuzungskombinationen. Der Anbau erfolgte an drei Orten im Jahr 2004.

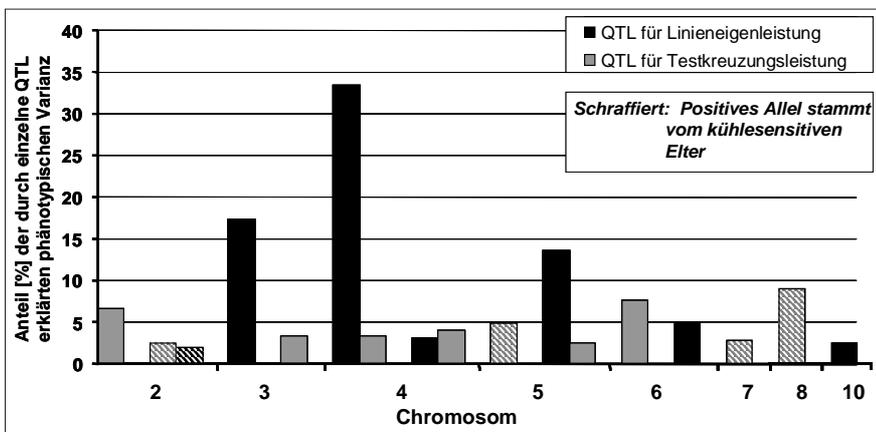


Abbildung 5: Anteil der durch einzelnen QTL erklärten phänotypischen Varianz und chromosomale Zuordnung der QTL. QTL mit sich überschneidenden Vertrauensintervallen sind durch aneinandergrenzende Säulen gekennzeichnet. Der Anbau erfolgte in 11 Umwelten in den Jahren 2001 und 2002.

klassische Rückkreuzungsmethode nach RINKE und SENTZ (1961) angewendet und zum anderen wurde ein markerbasierter Ansatz gewählt. Für die Rückkreuzungsmethode wurden als Donoren für Kühletoleranz exotische Linien aus dem Andenhochland verwendet. Nur eine dieser exotischen Linien erwies sich als signifikant kühetoleranter gegenüber dem rekurrenten Elter (SL bzw. D2; *Abbildung 1*). Allerdings wurden die Donorlinien CML-352, CML-354 und CML-356 nur in zweifacher, die restlichen dagegen in 18-facher Wiederholung je Standort geprüft. Dadurch ergeben sich relativ große Standardfehler für die drei ungenau geprüften Elternlinien (*Tabelle 2*).

In der Literatur finden sich zahlreiche Hinweise auf hohe Kühletoleranz bei Linien aus dem Andenhochland (z.B. EAGLES und LOTHROP 1994, BRANDOLINI et al. 2000). Allerdings wurden auch Linien mit nur mäßiger oder fehlender Toleranz entdeckt (EAGLES und HARDACRE 1979, BRANDOLINI et al. 2000). Die hier verwendeten Linien waren von CIMMYT unter Hochlandbedingungen selektiert worden. Offenbar benötigt die Maispflanze gegenüber der gleichmäßigen Kühle des tropischen Hochlandes andere Toleranzmechanismen als gegenüber dem stark wechselnden Kühlestress des mitteleuropäischen Klimas. Potentielle Donoren für Kühletoleranz sollten deshalb vor ihrem Einsatz in Rückkreuzungsprogrammen auf ihre Eignung im Zielgebiet geprüft werden.

Die BC2S2-Generation setzte sich aus gleichen Anteilen der Kreuzungskombinationen zusammen (*Tabelle 1*). Bei gleicher Eignung der Donorlinien sollten die Kreuzungskombinationen innerhalb der 20 % besten BC2S2-Linien gleich häufig auftreten. Tatsächlich waren außer den Kreuzungskombination des Donors CML-356 alle restlichen Kreuzungskombinationen vertreten. Übereinstimmend mit den Ergebnissen der Eigenleistungsprüfung der Donoren dominierten BC2S2-Linien des Donors CML-355. Allerdings waren auch BC2S2-Linien des Donors CML-350 innerhalb der 20 % besten BC2S2-Linien. Dieser war signifikant schlechter als die kühesensitiven, rekurrenten Eltern. Somit war die Leistung der Donorlinien

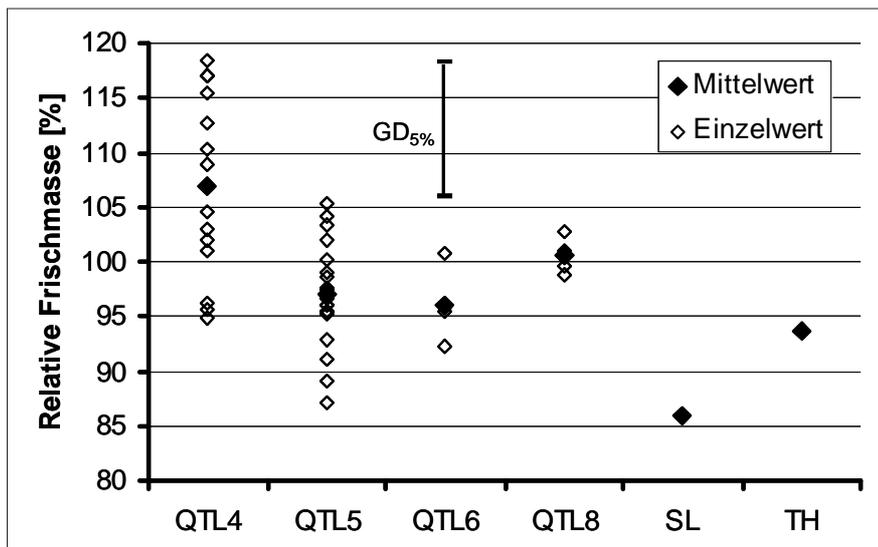


Abbildung 6: Linienleistung von SL, TH und den NILs für QTL4, QTL5, QTL6 und QTL8. Für QTL4 standen 14, QTL5 20 und für QTL6 und QTL8 jeweils 4 NILs zur Verfügung. Der Anbau erfolgte an vier Orten im Jahr 2005.

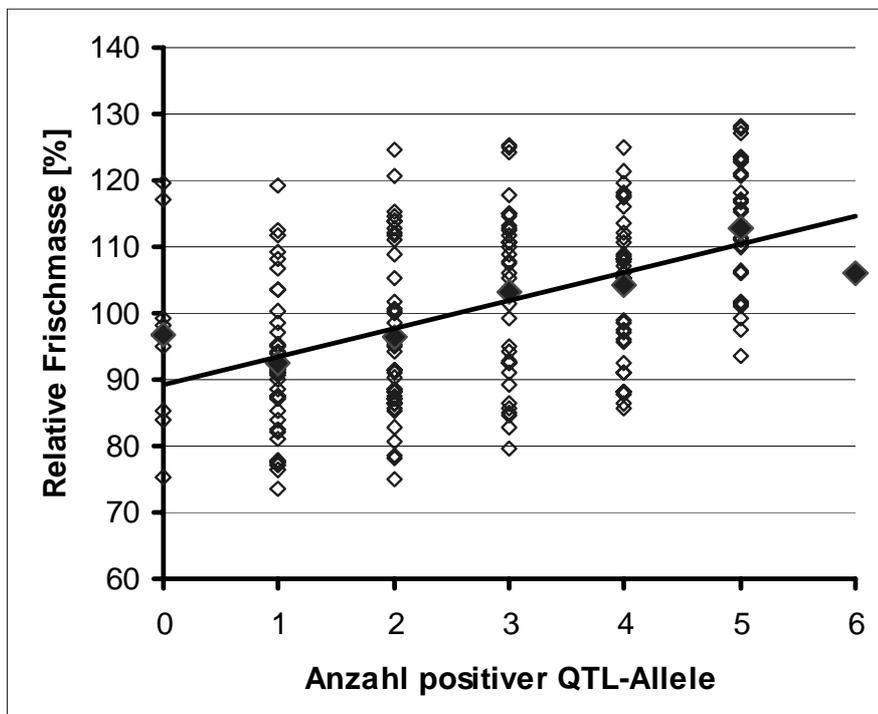


Abbildung 7: Abhängigkeit der Frischmasseleistung von der Anzahl positiver QTL-Allele für Kühletoleranz in einem Verifikationsexperiment mit 189 DH-Linien. Die Prüfung erfolgte in acht Umwelten.

nur teilweise auf die BC2S2-Linien übertragbar. Offenbar spielt der genetische Hintergrund für die Ausprägung der günstigen Allele eine entscheidende Rolle.

Die Eignung der rekurrenten Eltern lässt sich aus den Ergebnissen der BC2S1-Linien ableiten. Die SL-Kreuzungskombinationen erreichten im Mittel höhere Erträge als die D2-Kreuzungskombinationen (Tabelle 2). Allerdings wurde

insgesamt eine höhere Varianz innerhalb der D2-Kreuzungskombinationen erreicht. Offenbar befanden sich unter den übertragenen Donorchromosomfragmenten einige, die eine spezifische Eignung zur Komplementierung genetischer Defizite des Elters SL bzw. D2 besaßen. Von den BC3DH-Linien waren die meisten besser als ihre kühesensitiven, rekurrenten Eltern (Abbildung 3), obwohl nur zwei der Donorlinien in der Eigenleis-

tung den rekurrenten Eltern überlegen waren (Tabelle 2). Der Grund hierfür dürfte vor allem in der geringeren allgemeinen Anpassung der exotischen Donoren an die mitteleuropäischen Anbaubedingungen zu sehen sein. Kühletoleranz allein reicht für eine gute Jugendentwicklung offenbar nicht aus. Die Eignung als Donoren für Kühletoleranz wurde dadurch jedoch nicht beeinträchtigt.

Die Variationsbreite und das Mittel der BC2DH-Linien mit dem kühesensitiven, rekurrenten Elter SL waren dem von D2 vergleichbar (Abbildung 4). Auch in ihrer Kombinationsfähigkeit mit dem Flint-Tester sind sie ähnlich.

Es bestand keine Korrelation zwischen Linien- und Testkreuzungsleistung. Dieses Ergebnis deckt sich mit Resultaten von AIDUN et al. (1991) sowie HODGES et al. (1997). Sie untersuchten die Keimfähigkeit, den Feldaufgang und die Jugendentwicklung von adaptiertem Zuchtmaterial und kamen dabei zu dem Schluss, dass die Vorhersage der Kühletoleranz der Hybriden anhand obiger Merkmale nicht möglich ist.

Der QTL-Ansatz erfordert im Gegensatz zur Rückkreuzungsmethode, zuerst die Identifizierung und Lokalisierung der Genomregionen, die für die Ausprägung des gewünschten Zielmerkmals verantwortlich sind. In dieser Studie standen zwei Elitelinien SL und TH zur Verfügung, die sich hinsichtlich ihrer Kühletoleranz signifikant unterschieden (Thomas PRESTERL, mündliche Mitteilung). In der QTL-Analyse wurden für Linieneigenleistung sieben Genomregionen detektiert, wobei sechs positive QTL-Allele vom kühetoleranten Elter und ein positives QTL-Allel vom kühesensitiven Elter stammen. Für Testkreuzungsleistung wurden zehn QTL identifiziert, wobei vier das positive QTL-Allel des kühesensitiven Elters trugen. Auch FRACHEBOUD et al. (2004) sowie JOMPUK et al. (2005) detektierten QTL für Kühletoleranz und fanden positive Allele vom kühesensitiven Elter. Damit zeigt sich, wie schon bei den tropischen Donoren im Rückkreuzungsexperiment, dass auch Eltern mit geringer Anpassung an die jeweiligen Testbedingungen positive QTL-Allele besitzen können.

Vier QTL für Linieneigenleistung und vier für Testkreuzungsleistung befinden sich jeweils in demselben Markerintervall. Allerdings erklärten die QTL für Testkreuzungsleistung deutlich geringere Anteile der phänotypischen Varianz. Dies dürfte vor allem an der größeren genetischen Varianz zwischen den DH-Linien im Vergleich zu ihren Testkreuzungen liegen (COCKERHAM 1963). Darüberhinaus könnte es möglich sein, dass die Testerlinie an anderen Loci als den detektierten QTL größere Defizite aufweist.

Der bedeutsamste QTL für Linieneigenleistung im Frischmasseertrag wurde auf Chromosom 4 detektiert. Die bisher publizierten QTL-Studien über Kühletoleranz umfassen auch andere Merkmale als Frischmasseertrag. FRACHEBOUD et al. (2004) sowie JOMPUK et al. (2005) fanden einen QTL für Photoinhibition auf Chromosom 6, der 37,4 % bzw. 21 % der phänotypischen Varianz erklärte. Beide untersuchten die gleiche Population, wobei FRACHEBOUD et al. Klimakammerversuche und JOMPUK et al. Freilandversuche durchführten. Beide detektierten auch einen QTL auf Chromosom 4. Allerdings stimmen nur wenige der verwendeten Marker mit denen in unserer Studie überein, so dass ein direkter Vergleich der QTL-Positionen nicht möglich ist. Die Autoren fanden ebenfalls auf nahezu allen Chromosomen signifikante QTL für Kühletoleranz.

Die vorläufigen Ergebnisse der NILs bestätigen überzeugend die Leistungsüberlegenheit der Genotypen mit QTL4. Erstaunlich ist die geringe Abstufung zwischen den NILs für QTL5 und QTL6, deren Effekte sich in der Kartierungspopulation stark unterschieden. Bemerkenswert ist auch die sehr gute Leistung der NILs mit QTL8, der in der QTL-Analyse nur für Testkreuzungsleistung identifiziert worden war. Die Elternlinien SL und TH erreichten geringere Frischmasseerträge als die NILs, was auf Saatgutherkunftseffekten beruhen könnte.

Die QTL-Verifikation in rekombiniertem Material zeigte einen signifikanten Zusammenhang zwischen relativer Frischmasseleistung und Anzahl positiver QTL-Allele. Die nur mittelstraffe Korrelation liegt wahrscheinlich in der kom-

plexen Vererbung der Kühletoleranz begründet. Zur Ausprägung des Merkmals wirken Major- und Minorgene zusammen, von denen in der QTL-Analyse nur erstere detektiert werden.

Diese Studie zeigt, dass sowohl die Rückkreuzungsmethode als auch der QTL-Ansatz einen entscheidenden Beitrag zur Entwicklung von kühletoleranten Sorten liefern können. Mitentscheidend für den Erfolg ist bei beiden Verfahren vor allem das Ausgangsmaterial.

## 5. Zusammenfassung

Mais (*Zea mays* L.) ist eine wärmeliebende Pflanze, deren optimale Vegetationsbedingungen bei 25 bis 30°C liegen. Bei Temperaturen unter 20°C ist das Wachstum gehemmt und unter 6°C können irreparable Schäden auftreten. Ist der Mais während seiner Kornfüllungsphase kühlen Temperaturen ausgesetzt, zeigt sich dies in Ertragsverlusten und bei Silagemais in sinkendem Energiegehalt. Um diesen negativen Auswirkungen zu begegnen, ist die Entwicklung von kühletoleranten Maissorten ein wichtiges Zuchtziel in Mitteleuropa.

Kühletoleranz ist ein quantitatives Merkmal, das aufgrund seiner polygenischen Vererbung nur schwierig durch Züchtung zu verbessern ist. In dieser Studie sollte die Kühletoleranz von Mais aus dem Andenhochland durch mehrmalige Rückkreuzung, verbunden mit scharfer Selektion, in zwei kühesensitive Elitelinien (SL und D2) transferiert werden. Im Feld wurden 1072 BC2S1-Linien an zwei Orten und daraus selektierte 113 BC2S2-Linien an fünf Orten geprüft.

Zudem wurden aus den besten BC3-Linien insgesamt 211 doppelhaploide (DH) Linien erzeugt und an drei Orten auf Linien- und Testkreuzungsleistung geprüft. Die exotischen Maislinien unterschieden sich signifikant in ihrer Kühletoleranz. Sowohl bei SL- als auch bei den D2-Kreuzungskombinationen traten in allen geprüften Rückkreuzungsgenerationen Linien auf, die besser als der kühesensitive Elter waren. Die Testkreuzungsleistung war nicht mit der Linieneigenleistung korreliert. Sowohl die BC2S1- als auch die BC3-DH-Ergebnisse zeigen, dass es möglich ist, durch Einkreuzen exotischer Linien die Kühletoleranz ak-

tuellen mitteleuropäischen Zuchtmaterials zu verbessern.

In einem alternativen Ansatz wurden mittels QTL-Analyse (QTL = quantitative trait loci) Genombereiche mit signifikantem Einfluss auf die phänotypische Varianz des Frischmasseertrags detektiert. Hierzu wurden aus der Kreuzung kontrastierender Elitelinien 720 doppelhaploide Linien erzeugt. Für die Genotypisierung wurden 188 Mikrosatellitenmarker verwendet und die Genotypisierung erfolgte in mehrortigen, zweijährigen Feldversuchen. Es wurden sieben QTL für Kühletoleranz bei den DH-Linien *per se* und zehn bei deren Testkreuzungen mit einem kühesensitiven Tester gefunden. Vier dieser QTL liegen in denselben Markerintervallen.

Die Verifikation der wichtigsten QTL gelang zum einen durch die Entwicklung entsprechender nahe isogener Linien (NILs), wobei der QTL mit dem größten Einfluss auf die Varianz der Kartierungspopulation auch die größten Effekte bei den NILs zeigte. Zum anderen konnte in rekombiniertem DH-Linienmaterial eine signifikante Zunahme der Kühletoleranz bei steigender Anzahl positiver QTL beobachtet werden.

Insgesamt zeigen die Befunde, dass sowohl die Rückkreuzungsmethode als auch der QTL-Ansatz geeignete Verfahren für eine gezielte genetische Verbesserung der Kühletoleranz in aktuellem Maiszuchtmaterial darstellen.

## 6. Literaturverzeichnis

- ANDREW, R.H., 1954: Breeding maize for cold resistance. *Euphytica* **3**, 108-116.
- AIDUN, V.L., W.N. MIGUS and R.I. HAMILTON, 1991: Use of inbred seedling cold tolerance to predict hybrid cold tolerance in maize (*Zea mays* L.). *Can. J. Plant Sci.* **71**, 663-667.
- BRANDOLINI, A., P. LANDI, G. MONFREDINI and F. TANO 2000: Variation among Andean races of maize for cold tolerance during heterotrophic and early autotrophic growth. *Euphytica* **111**, 33-41.
- BROOKING, I.R., 1990: Variation amongst races of maize from Mexico and Peru for seedling emergence time at low soil temperatures. *Maydica* **35**, 35-40.
- COCKERHAM, C.C., 1963: Estimation of genetic variances. In: *Statistical Genetics and Plant Breeding*. W.D. Hanson, and H.F. Robinson (eds.) *Natn. Acad. Sci. Natn. Res. Council Publ.*, Washington, D.C. Pp. 53-94.
- DIEPENBROCK, W., F. ELLMER und J. LÉON, 2005: Ackerbau, Pflanzenbau und Pflanzen-

- züchtung. Verlag Eugen Ulmer Stuttgart. S. 238.
- DUCRUET, J.-M., M. ROMAN, M. HAVAUX, T. JANDA and A. GALLAIS, 2005: Cyclic electron flow around PSI monitored by afterglow luminescence in leaves of maize inbred lines (*Zea mays* L.): correlation with chilling tolerance. *Planta* **221**, 567-579.
- EAGLES, H.A. and I.R. BROOKING, 1981: Populations of maize with more rapid and reliable seedling emergence than cornbelt dents at low temperatures. *Euphytica* **30**, 55-763.
- EAGLES, H.A. and A.K. HARDACRE, 1979: Genetic variations in maize (*Zea mays* L.) for germination and emergence at 10°C. *Euphytica* **28**, 287-295.
- EAGLES, H.A. and J.E. LOTHROP, 1994: Highland Maize from Central Mexico - Its origin, characteristics, and use in breeding programs. *Crop Sci.* **34**, 11-19.
- FRACHEBOUD, Y., P. HALDIMANN, J. LEIPNER and P. STAMP, 1999: Chlorophyll fluorescence as a selection tool for cold tolerance of photosynthesis in maize (*Zea mays* L.). *J. Exp. Bot.* **50**, 1533-1540.
- FRACHEBOUD, Y., J.-M. RIBAUT, M. VARGAS, R. MESSMER and P. STAMP, 2002: Identification of quantitative trait loci for cold-tolerance of photosynthesis in maize (*Zea mays* L.). *J. Exp. Bot.* **53**, 1967-1977.
- FRACHEBOUD, Y., C. JOMPUK, J.-M. RIBAUT, P. STAMP and J. LEIPNER 2004: Genetic analysis of cold-tolerance of the photosynthesis in maize. *Plant Mol. Biol.* **56**, 241-253.
- HODGES, D.M, C.J. ANDREWS, D.A. JOHNSON and R. I. HAMILTON, 1997: Sensitivity of maize hybrids to chilling and their combining abilities at two developmental stages. *Crop Sci.* **37**, 850-856.
- HUND, A., Y. FRACHEBOUD, A. SOLDATI, E. FRASCAROLI, S. SALVI and P. STAMP, 2004: QTL controlling root and shoot traits of maize seedlings under cold stress. *Theor. Appl. Genet.* **109**, 618-629.
- HUND, A., E. FRASCAROLI, J. LEIPNER, C. JOMPUK, P. STAMP and Y. FRACHEBOUD, 2005: Cold tolerance of the photosynthetic apparatus: pleiotropic relationship between photosynthetic performance and specific leaf area of maize seedlings. *Mol. Breed.* **16**, 351-331.
- JOMPUK, C., 2004: Identification of quantitative trait loci associated with cold tolerance in maize (*Zea mays* L.). Dissertation ETH Zürich, Schweiz.
- JOMPUK, C., Y. FRACHEBOUD, P. STAMP and J. LEIPNER, 2005: Mapping of quantitative trait loci associated with chilling tolerance in maize (*Zea mays* L.) seedlings grown under field conditions. *J. Exp. Bot.* **56**, 1153-1163.
- LEIPNER, J., A. STEHLI and A. SOLDATI, 1999: Photosynthetic performance of exotic maize (*Zea mays* L.) germplasm from tropical highlands at low and high temperature. *J. Appl. Bot.* **73**, 20-24.
- MARYAM, B. and D.A. JONES, 1983: The genetics of maize growing at low temperatures. I. Germination of inbred lines and their F1's. *Euphytica.* **32**, 535-538.
- MOCK, J.J. and A.A. BAKRI, 1976: Recurrent selection for cold tolerance in maize. *Crop Sci.* **16**, 230-233.
- RINKE, E.H. and J.C. SENTZ, 1961: Moving corn belt germplasm northward. In W. Heckendorn and J. Sutherland (ed.) *Proc. 16<sup>th</sup> Annu. Corn and Sorghum Ind. Res. Conf.* **16**, 53-56. Am. Seed Trade Assoc., Washington, DC.
- UTZ, F., 2000: PLABSTAT: Ein Computerprogramm zur statistischen Analyse von pflanzenzüchterischen Experimenten: Version 2 N. Institut für Pflanzenzüchtung, Saatgutforschung und Populationsgenetik der Universität Hohenheim, Stuttgart.
- UTZ H.F. and A.E. MELCHINGER, 1996: PLAB-QTL: A program for composite interval mapping of QTL. *J. Quant. Trait Loci* **2**(1).
- VAN OOIJEN, J.W. and R. VOORRIPS, 2001: JoinMap Version 3.0 Software for the calculation of genetic linkage maps. Plant Research International, Wageningen, The Netherlands.
- ZEMETRA, R.S. and R.L. CUANY 1991: Variation among inbreds for seed response to low temperatures in maize (*Zea mays* L.). *Maydica* **36**, 17-23.

## Danksagung

Für die Betreuung von Versuchsflächen möchten wir den Herren R. KREPS, H. SEIFERT, G. WEGENER und G. ZIEGER von der KWS herzlich danken. Zudem gilt unser Dank dem CIMMYT, das uns die exotischen Linien zur Verfügung stellte. Für die hervorragende technische Unterstützung sei J. JESSE und S. KOCH sowie dem technischen Personal der KWS gedankt.

Das Projekt wurde vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) und KWS Saat AG im Rahmen des Forschungsverbundes GABI (Genomanalyse im biologischen System Pflanze) gefördert.