

Phänotypische und genetische Analyse der Frosttoleranz genetischer Ressourcen von Weizen unter Feldbedingungen

Phenotypic and genetic analysis of frost tolerance of wheat genetic resources under field conditions

Jörg Leipner^{1*}, Alex Giraud², Peter Stamp¹, Beat Keller³ und Caroline Plassé¹

Abstract

Frost tolerance is essential in wheat (*Triticum aestivum* L.) with rapidly fluctuating winter temperature in a changing climate. This study aimed to survey genetic resources for winter hardiness by investigating genetic and phenotypic diversity and by determining the genetic basis of frost tolerance by association mapping. The plant material was a set of 320 wheat accessions. A parametric genetic mixture analysis was conducted to analyze the population structure and identified twelve subpopulations. In order to characterize the frost tolerance, a subset of 103 accessions with contrasting genetic background were cultivated without snow cover in the French Jura in two winter seasons with a similar seasonal minimum temperature of about -30°C . For the maximum quantum efficiency of photosystem II primary photochemistry (F_v/F_m), leaf greenness and winter survival a large variation existed among the accessions and between the two winter seasons. The determination of F_v/F_m in combination with leaf greenness permitted a differentiation of the accessions in respect to their frost hardiness already at the beginning of winter. The gene *TaCBF12*, which codes for a transcription factor and seems to be located at the frost tolerance locus *Fr-A2* on chromosome 5A, was used as candidate gene. The sequence polymorphisms in the promoter region of this gene did not show an association with the traits analyzed, indicating that the genetic variation in *TaCBF12* does not play a major role in frost tolerance.

Keywords

Association study, chlorophyll fluorescence, frost tolerance, *Triticum aestivum*, winter survival

Einleitung

In den gemäßigten Klimazonen ist Frost einer der wichtigsten Faktoren, der die weitere Ausdehnung des Anbaus von Weizen (*Triticum aestivum* L.) verhindert. Eine Akklimatisierung an niedrige Temperaturen (unter ca. 10°C) erhöht beim Weizen sowie bei anderen winterharten Getreidearten die Frosttoleranz. Hierbei spielt die Temperatur, die Licht-

intensität und die zeitliche Dauer der Akklimatisierung eine gewichtige Rolle. Dennoch sind Frostschäden verantwortlich für regelmäßige Ertragsseinbußen im Winterweizenanbau. Die Notwendigkeit die Frosttoleranz im Weizen zu verbessern wurde schon früh erkannt, jedoch konnte diese in den vergangenen Jahrzehnten nur marginal gesteigert werden (LIMIN und FOWLER 1991). Ein Grund dafür mag die relativ enge genetische Basis des Zuchtmaterials sein. Die geringere genetische Variation von Weizensorten, im Vergleich zu Material aus Genbanken, und die geringere genetische Variation in Regionen außerhalb des Ursprungsgebiets von Weizen (HUANG et al. 2002) scheint hier zum Tragen zu kommen.

Die Bestimmung der Auswinterungsrate unter natürlichen Bedingungen ist das am häufigsten genutzte Merkmal, um die Frosthärte zu bestimmen. Jedoch sind Beobachtungen der Auswinterungsrate unter Feldbedingungen oft wenig aussagekräftig, da es bei sehr strengen Frösten häufig zu einem Absterben aller untersuchten Pflanzen kommt oder, im umgekehrten Fall, alle Pflanzen in zu milden Wintern überleben. Um diese Problematik zu umgehen, wurden andere Parameter gesucht, die die Frosthärte vorhersagen können. Eine Reihe von biochemischen, physiologischen und morphologischen Merkmalen zeigte gute Übereinstimmung mit der im Feld bestimmten Auswinterungsrate, jedoch besaßen sie den Nachteil, dass es sich um destruktive Verfahren handelte (FOWLER et al. 1981). Ein großes Potential, um den Einfluss von Umweltfaktoren auf die Funktion des photosynthetischen Apparates zu bestimmen, besitzt die Chlorophyll-Fluoreszenz-Analyse (FRACHEBOUD und LEIPNER 2003). Insbesondere das Verhältnis von variabler zu maximaler Fluoreszenz (F_v/F_m), welches die maximale Effizienz der primären photochemischen Reaktionen am Photosystem II (PSII) beschreibt, erscheint als verlässlicher Parameter, um Schäden am photosynthetischen Apparat zu quantifizieren (BJÖRKMAN und DEMMIG 1987). Dieser Parameter zeigte eine enge Korrelation mit dem Elektrolytverlust, wenn Getreide Frost ausgesetzt waren (z.B. RIZZA et al. 2001). Es muss jedoch beachtet werden, dass F_v/F_m nicht nur aufgrund von Schädigungen am PSII sondern auch während der persistenten Herabregulierung des photosynthetischen Apparates im Rahmen der

¹ Institut für Pflanzenwissenschaften, ETH Zürich, Universitätstraße 2, CH-8092 ZÜRICH

² INRA, Unité de Génétique et d'Amélioration des Plantes, 17 rue Sully, BP 86 510, F-21065 DIJON

³ Institut für Pflanzenbiologie, Universität Zürich, Zollikerstraße 107, CH-8008 ZÜRICH

* Ansprechpartner: Dr. Jörg LEIPNER, joerg.leipner@ipw.agrl.ethz.ch

Kälteakklimatisierung erniedrigt sein kann. Langanhaltende Frostperioden sind mit einer Abnahme des Chlorophyllgehaltes korreliert (HURRY et al. 1992), welcher somit auch zur Charakterisierung der Frosttoleranz unterschiedlicher Genotypen potentiell nutzbar ist.

Allele, die mit einer erhöhten Frosttoleranz assoziiert sind, sind interessante Kandidaten für markergestützte Selektion auf Frosttoleranz. Genotyp-Phänotyp Korrelationen können über Assoziationsstudien identifiziert werden. Neben der genomweiten Assoziationsstudie, welche eine extrem hohe Markerdichte voraussetzt, kann die genaue Haplotyp-Phänotyp-Assoziation auch für Kandidatengene bestimmt werden. Beide Verfahren setzen eine Einbeziehung und damit Bestimmung der Populationsstruktur voraus. Einen wichtigen QTL (Quantitative Trait Locus) für Frosttoleranz wurde auf Chromosom 5A in Weizen gefunden (VÁGÚJFALVI et al. 2003). Untersuchungen an *Triticum monococcum* zeigten, dass sich in dieser chromosomalen Region ein Cluster von 11 CBF (C repeat binding factor) Genen befindet (MILLER et al. 2006). Diese CBF Transkriptionsfaktoren spielen eine wichtige Rolle in der molekularen Antwort von Pflanzen auf abiotische Stressfaktoren und sind somit potentielle Kandidaten, die genotypische Variationen in der Frosttoleranz erklären könnten.

Ziel unserer Studie war es, genetische Ressourcen von Weizen phylogenetisch zu beschreiben und ein Subsample von wenig verwandten Akzessionen in Hinblick auf Frosttoleranz zu charakterisieren und die Haplotypen eines Kandidatengenes zu identifizieren, um eine Assoziationsstudie durchzuführen.

Material und Methoden

Pflanzenmaterial

Zweihundertachtundneunzig Weizenakzessionen (*Triticum aestivum* L.) wurden vom Agroscope Changins-Wädenswil (Schweiz) zur Verfügung gestellt. Darüber hinaus wurden 22 Akzessionen der INRA Dijon (Frankreich) in die Studie aufgenommen. Das Pflanzenmaterial stammte von 40 Ländern und beinhaltete 153 Winter-, 72 Sommer- und 3 Wechselweizen; der Typus der restlichen 92 Akzessionen war nicht in der European Wheat Database (EWDB, <http://genbank.vurv.cz/ewdb>) katalogisiert.

Phylogenetische Analyse

Dreiundzwanzig Mikrosatellitenmarker, welche 32 Loci detektierten, wurden aufgrund ihrer chromosomalen Lage ausgewählt und waren über das Genom verteilt. Dabei handelte es sich um 12 *Xgwm* Marker (IPK Gatersleben, Deutschland), 3 *Xwmc* Marker (Wheat Microsatellite Consortium), einen *Xbarc* Marker (USDA-ARS, Beltsville, USA) und 5 *Xcfa* Marker, einen *Xcfd* Marker und einen *Xgdm* Marker (INRA Clermont-Ferrand, Frankreich). Die genetische Diversität und Populationsstruktur wurde über ein Bayesian'sches Verfahren mit Hilfe des Programms Structure Vers. 2.2 bestimmt.

Frosttoleranzbestimmung

Für die Bestimmung der Frosttoleranz wurden 103 Weizenakzessionen an der INRA Dijon, Versuchsstation Chaux des

Prés, Département Jura, Frankreich (46°30' N, 5°52' E, 875 m N.N.) angezogen. Die Aussaat erfolgte in der ersten Oktoberwoche 2004 und 2005. Die Bildung einer Schneedecke auf den Pflanzen wurde durch die Installation eines rollbaren Gewächshauses verhindert, welches bei Schneefall automatisch über die Versuchsparzelle gerollt wurde. In monatlichen Abständen wurde die Blattgrüne (SPAD 502, Minolta, Japan) und die maximale Effizienz der primären photochemischen Reaktionen am PSII, F_v/F_m (PAM 2000, Walz, Effeltrich, Deutschland) bestimmt. Die Auswinterungsrate wurde während des Wiederaufwuchses Anfang April festgestellt und diente zusammen mit der Bonitur der Blattschäden nach jedem starken Frost zur Bestimmung der Winterhärte nach GEVES (Groupe d'Étude et de contrôle des Variétés et des Semences) auf einer Skala von 1 bis 9 im Vergleich zu acht Standardlinien (LECOMTE et al. 2003).

Assoziationsstudie

Die am *Fr-A2* Locus liegenden CBF Transkriptionsfaktoren (MILLER et al. 2006) wurden als Kandidatengene für die Assoziationsstudie gewählt. Basierend auf der Sequenz des *CBF12* Genes von *T. monococcum* (J. DUBCOVSKY, pers. Mitt.) wurden Primer entwickelt, die spezifisch für die homologe Region auf Chromosom 5A in hexaploiden Weizen waren. Die Promoterregion dieses Genes (*TaCBF12*) wurde in den 103 Weizenakzessionen sequenziert und diente der Assoziationsstudie, welche mit dem Programm TASSEL Vers. 2.0.1 durchgeführt wurde (BRADBURY et al. 2007).

Ergebnisse

Die Untersuchung der genetischen Diversität an 32 Loci mit 23 SSR Markern ergab eine durchschnittliche Anzahl an Allelen von 10.3 pro SSR Locus. Die höchste genetischen Diversität unter den 320 Akzessionen wurde unter den südamerikanischen Akzessionen gefunden. Das Bayesian'sche Verfahren zur Bestimmung der Populationsstruktur identifizierte mit einer hohen Wahrscheinlichkeit 12 Subpopulationen. Die meisten dieser Subpopulationen beinhalteten hauptsächlich Akzessionen aus einer bestimmten Region oder bestanden zum großen Teil aus einer spezifischen Unterart.

Für die beiden Versuchsjahre wurden mit 28.4°C (2004/05) und 28.9°C (2005/06) ähnliche absolute Tiefsttemperaturen gemessen. Deutliche Unterschiede gab es jedoch im Temperaturverlauf. Während im ersten Winter (2004/05) nach einem milden Herbst die Temperatur sukzessive fiel und am 1. März 2005 ihr Minimum für diesen Winter erreichte, fiel die Temperatur im zweiten Winter (2005/06) nach einem warmen Herbst schneller und blieb, nachdem die saisonale Tiefsttemperatur am 30. Dezember 2005 gemessen wurde, für lange Zeit auf einem niedrigen Niveau.

Die 103 Weizenakzessionen wurden nach ihrer Winterhärte im Vergleich zu 8 Standardlinien klassifiziert. Akzessionen aus Australien, Südamerika und Südeuropa erwiesen sich als deutlich weniger frosttolerant als Akzessionen aus Nordamerika und aus Ost- und Nordeuropa. Während die Klassifizierung der Akzessionen in Bezug auf Winterhärte in beiden Wintern sehr ähnlich war ($r^2=0.91$), zeigte sich

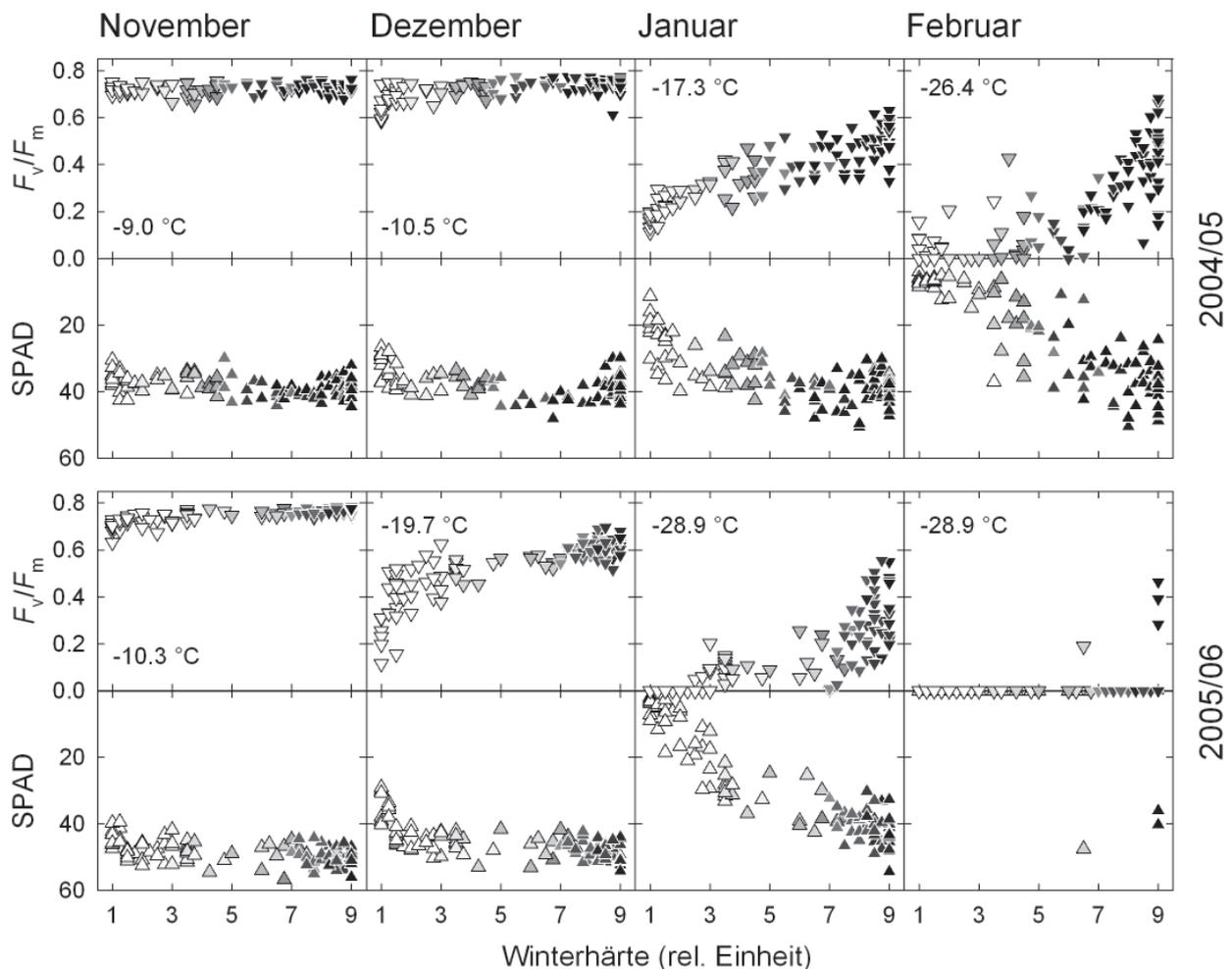


Abbildung 1: Abhängigkeit der maximalen Effizienz der primären Photochemie am PSII (F_v/F_m) und der Blattgrüne (SPAD) von der Winterhärte (GEVES Skala) im Verlaufe der Versuchswinter 2004/05 und 2005/06. Dargestellt sind die Mittelwerte von 10 Wiederholungen. Die Farbe der Symbole repräsentieren die Auswinterungsraten von weiß (100%) bis schwarz (0%). Die absoluten Tiefsttemperaturen zwischen Feldaufbau und den entsprechenden Messtagen sind angegeben

Figure 1: Relationship between maximum quantum efficiency of photosystem II primary photochemistry (F_v/F_m), leaf greenness (SPAD) and winter hardness (GEVES scale) throughout the two winter seasons (2004/05 and 2005/06). Values are means of 10 measurements. The accessions were coded on a grey scale according to their winter survival rate (white, 0% winter survival; black, 100% winter survival). The minimum temperature before measurements is indicated for each sampling date

ein starker Jahreseffekt bei der Auswinterungsrate. Den Winter 2004/05 überlebte eine deutlich höhere Anzahl an Akzessionen verglichen zum Winter 2005/06. Insbesondere Akzessionen mit einer moderaten Auswinterungsrate in 2004/05 zeigten eine hohe Auswinterungsrate in 2005/06.

Die maximale Effizienz der primären Photochemie am PSII (F_v/F_m) und die Blattgrüne (SPAD) nahmen ab, wenn die Temperatur unter 15°C fiel. Dabei zeigte sich, dass F_v/F_m früher bzw. bei weniger tiefen Temperaturen reagierte als SPAD (Abbildung 1). Trotzdem zeigten beide Parameter ab dem Zeitpunkt, bei dem sie die Akzessionen diskriminieren konnten, eine gute Korrelation. Zu diesem Zeitpunkt korrelierten beide Parameter gut mit der Auswinterungsrate. Die unterschiedlich starke Reaktion von F_v/F_m und SPAD auf Frosttemperaturen spiegelte sich auch im zeitlichen Verlauf ihrer Korrelation zur Auswinterungsrate wieder (Abbildung 2). Am Ende des Winters, besonders am Ende des Winters

2005/06, zeigten viele Weizenakzessionen starke Nekrosen und konsequenterweise war SPAD und insbesondere F_v/F_m in diesen Pflanzen Null oder nahe Null.

Die Akzessionen konnten über eine hierarchische Clusteranalyse aufgrund des zeitlichen Verlaufs von F_v/F_m in vier Gruppen eingeteilt werden. Die erste Gruppe bestand aus Akzessionen mit einer hohen Auswinterungsrate in beiden Wintern. Die meisten Mitglieder dieser Gruppe waren hauptsächlich Sommerweizen von Südamerika, insbesondere aus Brasilien, und von Australien. Die zweite Gruppe zeigte eine niedrige im ersten (2004/05) und eine hohe Auswinterungsrate im zweiten Winter (2005/06). Sie bestand aus Akzessionen von Argentinien, Chile und Westeuropa. In der dritten Gruppe waren Akzessionen vertreten, die eine niedrige Auswinterungsrate in beiden Wintern zeigten. Interessanterweise beinhaltete diese Gruppe auch die Sommerweizen Porvenir (Uruguay) und Seewari 48 (Australi-

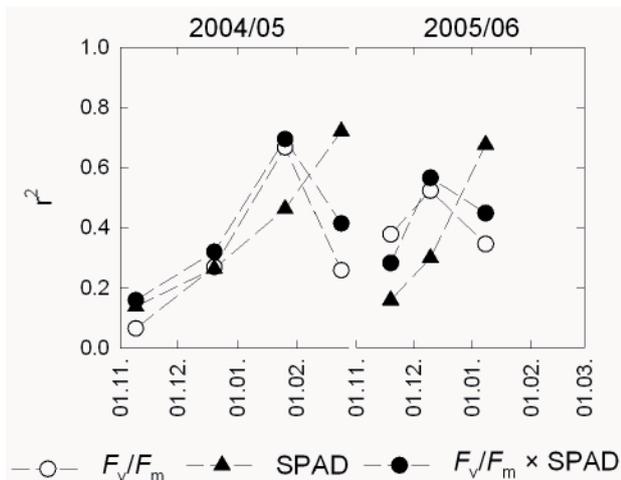


Abbildung 2: Bestimmtheitsmaß (r^2) für die Korrelationen zwischen Auswinterungsrate und der maximalen Effizienz der primären Photochemie am PSII (F_v/F_m), der Blattgrüne (SPAD) und dem Produkt aus F_v/F_m und SPAD im Verlaufe der Winter 2004/05 und 2005/06

Figure 2: Coefficient of determination (r^2) for the correlations between winter survival and maximum quantum efficiency of photosystem II primary photochemistry (F_v/F_m), leaf greenness (SPAD) and the product of F_v/F_m and SPAD during the time course of winter 2004/05 and 2005/06

en). Die vierte Gruppe bestand aus drei Winterweizen, die eine extrem hohe Frosttoleranz zeigten; diese waren Ridit und Cheyenne (USA), sowie die Landsorte Wagrein 1371 (Österreich).

Die Promotorregion des Weizenhomologes vom Gen *CBF12* in *T. monococcum* wurde in den auf Frosttoleranz untersuchten Weizenakzessionen sequenziert. Zwei Haplotypen (*TaCBF12-a* und *TaCBF12-b*) wurden identifiziert. Diese Haplotypen unterschieden sich in neun vollständig assoziierten single nucleotide polymorphisms (SNPs). Diese Sequenzpolymorphismen zeigten jedoch keine eindeutige Assoziation mit den untersuchten Merkmalen der Frosttoleranz.

Diskussion

Genetische Ressourcen sind von hohem Interesse für die Züchtung von stresstoleranten Kulturpflanzen. In dieser Arbeit wurden genetische Ressourcen von Weizen auf ihre Frosttoleranz untersucht. Das Projekt wurde in drei Schritten durchgeführt: (i) phylogenetische Charakterisierung eines umfangreichen Sets von Weizenakzessionen, (ii) Untersuchung der Frosttoleranz eines genetisch divergenten Subsets und (iii) Nutzung dieser phänotypischen Daten für eine Kandidatengen basierende Assoziationsstudie.

Die phylogenetische Charakterisierung des Weizenmaterials mit 23 Mikrosatelliten (SSR) Markern, welche 32 Loci detektierten, deckte ein hohes Grad an genetischer Variabilität im untersuchten Material auf. Die mittlere Anzahl an Allelen per Mikrosatellit war ähnlich wie in der Studie von RÖDER et al. (2002) an 500 europäischen Weizensorten. Die Bestimmung der Populationsstruktur über das Bayesian'sche Verfahren erwies sich als erfolgreich, da die

Gendiversität in den Gruppen kleiner war als in der Gesamtheit des Materials. Außerdem reflektierten die Gruppen geographische Herkünfte. Trotzdem wurde ein großes Maß an *Admixture* festgestellt, das aufgrund eines weltweiten Austauschs von Zuchtmaterial erklärt werden kann. Das breite genetische Spektrum spiegelte sich in der großen Variation der Frosttoleranz wider. Von einigen Sorten wie Vakka und Äring II (HÖMMÖ 1994) und insbesondere von Cheyenne (FOWLER und GUSTA 1979) konnte die schon bekannte gute Frosttoleranz bestätigt werden. Das Auftreten der beiden Sommerweizensorten Porvenir und Seewari 48 im frosttoleranten Material erscheint erstaunlich, könnte aber durch Missetikettierung in der Genbank begründet sein. Möglich wäre jedoch auch, dass eine Frosttoleranz erhalten blieb, da beide Sorten Winterweizen in ihren Pedigrees aufweisen.

Die Abnahme der maximalen Effizienz der primären Photochemie am PSII (F_v/F_m) war eine erste Antwort auf den Frost. Bei frostsensitiven Akzessionen geschah diese schon bei Temperaturen von ca. -10°C . Ob diese Abnahme von F_v/F_m das Ergebnis einer dauerhaften Herabregulierung von PSII oder einer Schädigung von PSII war, konnte nicht abschließend geklärt werden. Wahrscheinlich fand zunächst eine Herabregulierung des photosynthetischen Apparates statt. Bei stärkeren Frost akkumulierten reaktive Sauerstoffverbindungen, die letztendlich den photosynthetischen Apparat schädigten und zu einem Verlust der Blattgrüne führten. Das Ausmaß dieser Schädigungen war trotz ähnlicher Tiefsttemperaturen in beiden Versuchswinter unterschiedlich. Es ist bekannt, dass die Temperaturgeschichte einen großen Einfluss auf die Akklimatisation hat (FOWLER et al. 1999). Setzt man das mathematische Modell für die Frostakklimatisation und Frosttoleranz von FOWLER et al. (1999) für die beiden Versuchswinter ein, wird ersichtlich, dass die höhere Auswinterungsrate in 2005/06 durch die milden Temperaturen im Oktober und den starken Temperaturabfall im November und Dezember verursacht war. Eine weitere Ursache für die deutlich höhere Auswinterungsrate in 2005/06 kann in den lang anhaltenden und wiederkehrenden strengen Frösten zwischen Dezember und Mitte März liegen, da bekannt ist, dass die Dauer der Frostperiode einen Einfluss auf die Blattschäden hat (LECOMTE et al. 2003).

Im Winter 2005/06 stand die Auswinterungsrate im Einklang mit der Winterhärte nach der GEVES Skala; nur Akzessionen oder Standardsorten mit einem Winterhärtegrad von 9, welches einer Frosttoleranz von 28°C entspricht (LECOMTE et al. 2003), überlebten den Winter. Im Unterschied dazu überlebten den Winter 2004/05 Akzessionen mit einem Winterhärtegrad von 6.5, welches eine theoretische Frosttoleranz von -23°C entspricht, obwohl die Temperatur auf Pflanzenhöhe bis auf -32°C absank. Scheinbar kann Weizen nach einer optimalen Akklimatisation weit stärkere Fröste aushalten als unter „normalen“ Akklimatisationsbedingungen; die Geschwindigkeit mit der sich die Pflanzen akklimatisieren können, scheint hierbei von großer Bedeutung zu sein. Eine Akzession mit mittlerer Frosttoleranz, die sich scheinbar schnell akklimatisieren kann, ist die alte Sorte Cache aus den USA. Sie war im zweiten Winter sogar besser klassiert als im ersten.

Interessanterweise ist ein Elternteil von Cache die extrem frosttolerante Sorte Redit.

Eine weitere Charakterisierung des Materials in Hinblick auf die Frosttoleranz konnte erreicht werden, in dem regelmäßig physiologische Parameter bestimmt wurden. Die Clusteranalyse des zeitlichen Verlaufs von F_v/F_m ermöglichte es, die Akzessionen in vier distinkte Gruppen einzuteilen, die sowohl die maximale Frosttoleranz der Akzessionen als auch deren Akklimatisationsgeschwindigkeit widerspiegelte. Die regelmäßige Bestimmung der physiologischen Parameter kann in der Praxis einen großen Vorteil gegenüber der klassischen Aufnahme der Auswinterungsrate haben. Durch die Messung von F_v/F_m und SPAD konnte nämlich schon früh im Winter, als die Temperaturen noch nicht Werte unter -20°C erreichten, das Material für seine Frosttoleranz diskriminiert werden. Diese Messungen ermöglichen es somit, auch an Standorten, an denen es nicht zur Auswinterung des Untersuchungsmaterials kommt, die Winterhärte zu charakterisieren.

QTL Analysen in einigen wenigen Kartierungspopulationen zeigten, dass für die Ausprägung der Frosttoleranz der Locus *Fr-A2* auf Chromosom 5A von großer Bedeutung zu sein scheint (VÁGÚJFALVI et al. 2003). Um eine allgemeingültige Aussage über die Bedeutung dieses Locus für die Winterhärte machen zu können, sind Assoziationsstudien notwendig. Das Gen *TaCBF12*, beziehungsweise dessen Promotorregion, wurde als Kandidatengen gewählt. MILLER et al. (2006) zeigten, dass in *T. monococcum* das Gen *CBF12* innerhalb eines Clusters von 11 *CBF* Genen im *Fr-A^m2* Locus liegt. Man kann daher davon ausgehen, dass *TaCBF12* am *Fr-A2* lokalisiert ist. Die Assoziationsstudie zeigte jedoch, dass die SNPs in der *TaCBF12* Promotorregion keine große Rolle in der genetischen Variation der Frosttoleranz zu spielen scheinen. Kleine oder epistatische Effekte können dennoch nicht ausgeschlossen werden.

Literatur

- BJÖRKMAN O, DEMMIG B, 1987: Photon yield of O_2 evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77 K among vascular plants of diverse origins. *Planta* 170, 489-504.
- BRADBURY PJ, ZHANG Z, KROON DE, CASSTEVENS TM, RAMDOSS Y, BUCKLER ES, 2007: TASSEL: software for association mapping of complex traits in diverse samples. *Bioinformatics* 23, 2633-2635
- FOWLER DB, GUSTALV, 1979: Selection for winterhardiness in wheat. I. Identification of genotypic variability. *Crop Sci* 19, 769-772.
- FOWLER DB, GUSTALV, TYLER NJ, 1981: Selection for winterhardiness in wheat. III. Screening methods. *Crop Sci* 21, 896-901.
- FOWLER DB, LIMIN AE, RITCHIE JT, 1999: Low-temperature tolerance in cereals: Model and genetic interpretation. *Crop Sci* 39, 626-633.
- FRACHEBOUD Y, LEIPNER J, 2003: The application of chlorophyll fluorescence to study light, temperature, and drought stress. In: DeEll JR, Toivonen PMA (eds.), *Practical applications of chlorophyll fluorescence in plant biology*, pp 125-150. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- HÖMMÖLM, 1994: Hardening of some winter wheat (*Triticum aestivum* L.), rye (*Secale cereale* L.), *triticale* (\times *Triticosecale* Wittmack) and winter barley (*Hordeum vulgare* L.) cultivars during autumn and the final winter survival in Finland. *Plant Breed* 112, 285-293.
- HUANG XQ, BÖRNER A, RÖDER MS, GANAL M, 2002: Assessing genetic diversity of wheat (*Triticum aestivum* L.) germplasm using microsatellite markers. *Theor Appl Genet* 105, 699-707.
- HURRY VM, KROL M, ÖQUIST G, HUNER NPA, 1992: Effect of long-term photoinhibition on growth and photosynthesis of cold-hardened spring and winter wheat. *Planta* 188, 369-375.
- LECOMTE C, GIRAUD A, AUBERT V, 2003: Testing a predicting model for frost resistance of winter wheat under natural conditions. *Agronomie* 23, 51-66.
- LIMIN AE, FOWLER DB, 1991: Breeding for cold hardiness in winter wheat - problems, progress and alien gene-expression. *Field Crops Res* 27, 201-218.
- MILLER AK, GALIBA G, DUBCOVSKY J, 2006: A cluster of 11 *CBF* transcription factors is located at the frost tolerance locus *Fr-A^m2* in *Triticum monococcum*. *Mol Genet Genomics* 275, 193-203.
- RIZZA F, PAGANI D, STANCA AM, CATTIVELLI L, 2001: Use of chlorophyll fluorescence to evaluate the cold acclimation and freezing tolerance of winter and spring oats. *Plant Breed* 120, 389-396.
- RÖDER M, WENDEHAKKE K, KORZUN V, BREDEMEIJER G, LABORIE D, BERTRAND L, ISAAC P, RENDELL S, JACKSON J, COOKE RJ, VOSMANN B, GANAL M, 2002: Construction and analysis of a microsatellite-based database of European wheat cultivars. *Theor Appl Genet* 106, 67-73.
- VÁGÚJFALVIA, GALIBA G, CATTIVELLI L, DUBCOVSKY J, 2003: The cold-regulated transcriptional activator *Cbf3* is linked to the frost-tolerance locus *Fr-A2* on wheat chromosome 5A. *Mol Genet Genomics* 269, 60-67.