

Abschlussbericht Teilprojekt 2

Verbesserung der Kältetoleranz von Mais

Projektverbund BayKlimaFit

Strategien zur Anpassung von Kulturpflanzen an den
Klimawandel

Finanziert durch

Bayerisches Staatsministerium für
Umwelt und Verbraucherschutz
Rosenkavalierplatz 2
81925 München

Projektnehmer

Technische Universität München
Lehrstuhl für Pflanzenzüchtung
Prof. Dr. Chris-Carolin Schön
Liesel-Beckmann-Straße 2
85354 Freising
Tel.: 08161-713421
Fax: 08161-714511
E-Mail: chris.schoen@tum.de
Web: www.bayklimafit.de

Berichtszeitraum:

1. Februar 2016 bis 31. Januar 2019

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	2
1 Kurzzusammenfassung.....	3
2 Einführung.....	4
2.1 Kartierung von Genomregionen für Kältetoleranz in Mais.....	4
2.2 Molekulare Grundlagen der Kältetoleranz in Mais	4
2.3 Züchterische Nutzung von Mais Landrassen.....	5
3 Zielstellung.....	6
4 Ergebnisse und Diskussion	7
4.1 Materialerstellung durch Gametenfang und Phänotypisierung für Kältetoleranz und Jugendentwicklung im Feldversuch.....	7
4.2 Diversität und populationsgenetische Analysen.....	11
4.3 Lokalisierung von Genomregionen für Kältetoleranz und Jugendentwicklung ...	14
4.4 Genomische Leistungsvorhersage	15
4.5 Erstellung einer <i>de novo</i> Referenzsequenz für Flint	18
4.6 Bioinformatische Analysen für den Verbund BayKlimaFit.....	20
4.7 Voraussichtlicher Nutzen und Einordnung der Projektergebnisse mit Bezug zum Klimawandel.....	22
5 Veröffentlichungen im Rahmen des Projekts	23
6 Vernetzungen	25
7 Bestehende und entstandene Industriebeteiligung.....	26
8 Zusammenfassung	26
9 Ausblick.....	27
Literaturverzeichnis.....	28
Abkürzungsverzeichnis.....	32
Anhang	33

1 Kurzzusammenfassung

Die Verbesserung der Kältetoleranz von Mais ermöglicht eine schnelle Jugendentwicklung zu Beginn der Vegetationsperiode und frühere Aussaattermine. Eine raschere Bodenbedeckung trägt wesentlich zur Verminderung von witterungsbedingter Bodenerosion und zur Reduzierung der Nährstoffauswaschung bei.

Ziel des Projektes war es, genetische Faktoren zu finden, die in europäischen Mais Landrassen an der Ausprägung von Kältetoleranz beteiligt sind. Für drei ausgewählte Landrassen wurden neuartige genetische Linien für die Erfassung der Kältetoleranz und Jugendentwicklung in Feldversuchen sowie für molekulare Analysen erzeugt. Es wurden Genomregionen in den aus den Landrassen hervorgegangenen Linien identifiziert, die an der Ausprägung von Kältetoleranz und an der Jugendentwicklung beteiligt sind. Basierend auf den erzielten Ergebnissen wurden Strategien für die züchterische Nutzung vorgeschlagen. Die Strategien nutzen die natürliche Biodiversität von Landrassen, um genetische Faktoren, die mit der Ausprägung von Kältetoleranz zusammenhängen, in Zuchtmaterial einzubringen. Das Projekt leistete einen Beitrag zum besseren Verständnis der molekularen Mechanismen der Kältetoleranz und der Anpassung von Mais an den Klimawandel unter Schonung knapper Ressourcen, wie Nährstoffen, Wasser und Boden.

2 Einführung

Im Zuge des Klimawandels werden für Bayern vermehrt instabile Temperatur- und Niederschlagsverteilungen sowie eine verstärkte Bodenerosion erwartet. Mais ist neben Weizen in Bayern eine der bedeutendsten Kulturarten. Aufgrund hoher Kühlesensitivität ist die Aussaat von Mais meist erst Ende April möglich, was häufig zu unerwünschten Folgen wie Bodenerosion, Unkrautbesatz und Nährstoffauswaschung führt. Angesichts der für Bayern prognostizierten Szenarien für den Klimawandel, wie z. B. häufigere Starkniederschlagsereignisse [1], steht zu befürchten, dass sich im Maisanbau der Interessenskonflikt zwischen einer hohen pflanzlichen Biomasseproduktion und umweltgerechtem, ressourcenschonendem Anbau verstärkt. Das Projekt hatte zum Ziel, mittels biotechnologischer, pflanzen genetischer Forschung zur züchterischen Anpassung von Mais an die Folgen des Klimawandels Lösungswege für diesen Konflikt aufzuzeigen.

2.1 Kartierung von Genomregionen für Kältetoleranz in Mais

Die ursprünglich subtropische Kulturart Mais hat sich im Zuge ihrer weltweiten Verbreitung an sehr variable Umweltbedingungen angepasst. Für den Anbau in Europa war dafür vor allem ein früherer Reifezeitpunkt und Toleranz gegen kühle Temperaturen erforderlich. Mitteleuropäische Maishybriden gehen vor allem auf eine Kombination von Linien aus den Dent und Flint Genpools zurück [2]. Während der Dent Genpool kaum über Kältetoleranz verfügt [3, 4], wurde im Flint Genpool eine höhere Kältetoleranz gefunden [5, 6]. Bisherige Studien zur Lokalisierung von Genomregionen für das komplex vererbte Merkmal Kältetoleranz wurden jedoch meist im Dent Genpool durchgeführt [7 - 9], während für den Flint Genpool kaum Erkenntnisse vorliegen. Im Rahmen einer Masterarbeit am Lehrstuhl für Pflanzenzüchtung wurden Genomregionen kartiert, die quantitativ vererbte Merkmale, wie zum Beispiel die Kältetoleranz, beeinflussen. Solche Regionen werden als „*quantitative trait loci*“ (QTL) bezeichnet. Im Rahmen dieser vergleichenden QTL-Studie zwischen Dent und Flint Kartierungspopulationen zeigte sich, dass nur sehr wenige QTL für Kältetoleranz Genpool-übergreifend sind [10]. Das bedeutet, dass sich die Genpools komplementär entwickelt haben. Auch für andere Merkmale wie Blühzeitpunkt, Wuchshöhe und Biomasseertrag haben sich solche komplementären Muster gezeigt, die mit der divergenten Entwicklung der Genpools erklärt werden [11].

2.2 Molekulare Grundlagen der Kältetoleranz in Mais

Sind junge Maispflanzen Temperaturen unter 10°C ausgesetzt, wie sie nach der Aussaat unter mitteleuropäischen Bedingungen vorkommen können, treten Schädigungen der Zellen und Gewebe auf [12]. Als unmittelbare Reaktionen auf den Kältereiz werden unter anderem eine Inhibierung der Photosynthese, geringere Photosyntheseleistung, das Auftreten reaktiver Sauerstoffspezies und die Induktion von Signaltransduktionsketten unter Beteiligung von stressabhängigen Transkriptionsfaktoren, Abscisinsäure (ABA) und Salicylsäure beobachtet [13 - 16]. Weiterhin finden Veränderungen im Lipidstoffwechsel, der Kohlenstoffassimilation, der Zellzyklusaktivitäten, des Wurzelwachstums und der Wasseraufnahme über die Wurzeln

statt [17 - 19]. Trotz der zunehmend verfügbaren Erkenntnisse über physiologische Änderungen und Reaktionen auf Ebene der Genexpression sind die ursächlichen Zusammenhänge zwischen diesen kurzzeitigen Kältereaktionen und langfristigen Prozessen wie der Ertragsleistung noch kaum verstanden [20]. Durch die Assoziationsgenetik werden in genomweiten Analysen Zusammenhänge zwischen allelischen Varianten an Markerloci mit phänotypischen Ausprägungen verschiedener Merkmale detektiert. So kann im Bereich dieser Genomregionen gezielt nach plausiblen Kandidatengenen für die Analyse der an der Kältetoleranz beteiligten genetischen Netzwerke gesucht werden.

2.3 Züchterische Nutzung von Mais Landrassen

Landrassen von Nutzpflanzen werden als wertvolle Quelle bisher ungenutzter allelischer Variation angesehen, allerdings gibt es bisher keine effizienten Strategien für die gezielte Nutzung der Landrassen zur Verbesserung von Elitematerial. Insbesondere bei Fremdbefruchtern wie Mais handelt es sich bei Landrassen um heterogene und heterozygote Populationen, was eine robuste Phänotypisierung und auch die Genotypisierung erschwert [21]. Für die Auswahl genetischer Ressourcen zur Nutzbarmachung nativer Diversität können verschiedene Strategien verfolgt werden. Zum einen können aus möglichst vielen Landrassen jeweils wenige Individuen untersucht werden. Dies kann sinnvoll sein, wenn eine möglichst breite Diversität erfasst werden soll, um beispielsweise evolutionäre Fragen zu klären oder Genomregionen zu identifizieren, die für die Adaptation an unterschiedliche Umwelten relevant sind [22]. Eine alternative Strategie kann darin bestehen, anhand genotypischer und eventuell phänotypischer Daten aus Pilotprojekten eine Vorauswahl geeigneter Landrassen zu treffen und aus diesen Landrassen jeweils eine größere Zahl an Individuen zu charakterisieren. Dabei bietet es sich an, Landrassen zu verwenden, deren genetischer Hintergrund dem zu verbessernden Elitematerial ähnlich ist, da so in geringerem Maße mit unerwünschten Effekten aufgrund nicht angepasster Phänologie zu rechnen ist. Der Vorteil dieser zweiten Strategie besteht unter anderem darin, dass kaum mit Populationsstruktur gerechnet werden muss und in frei abblühenden Populationen ein geringes Kopplungsphasenungleichgewicht („*linkage disequilibrium*“, LD) vorherrschen sollte. Zudem ist bekannt, dass bei Fremdbefruchtern wie Mais der größte Anteil der genotypischen und phänotypischen Variation innerhalb von Populationen gefunden wird, während Unterschiede zwischen Populationen einen geringeren Teil der Variation erklären [23]. Die Entwicklung homozygoter Inzuchtlinien aus Landrassen durch Selbstung ist jedoch zeitaufwändig und aufgrund der hohen genetischen Bürde nicht immer erfolgreich. Für eine robuste Phänotypisierung der ausgewählten Landrassen eignen sich doppelhaploide (DH) Linien [24]. Die Herstellung von DH-Linien ist allerdings aufgrund der genetischen Bürde der Landrassen ebenfalls sehr aufwändig [25]. Alternativ können über den sogenannten Gametenfang die Gameten einer Landrasse durch Kreuzung mit einer Inzuchtlinie zugänglich gemacht und damit die allelischen Effekte geprüft werden [26]. Thema dieses Projektes war zu untersuchen, in welcher Form die verschiedenen Strategien zur Nutzbarmachung von Landrassen bezüglich Stichprobenwahl und Materialentwicklung optimal mit den heute verfügbaren genombasierten Methoden kombiniert werden können.

3 Zielstellung

In einem ersten Schritt sollte eine breite Kollektion von 35 europäischen Landrassen und die aus drei ausgewählten Landrassen entwickelten Gametenfang-Linien molekular und populationsgenetisch charakterisiert werden (Arbeitspaket 1). Die Genotypisierungsdaten der ursprünglichen Landrassen standen zu Projektbeginn zur Verfügung, die Daten der Gametenfang-Linien wurden im Rahmen des Projekts erhoben. Anhand genomweiter Genotypisierungsdaten sollten wichtige populationsgenetische Parameter innerhalb und zwischen Landrassen untersucht werden. Dies erlaubt Aussagen darüber, mit welcher Strategie Landrassen möglichst effizient für genomweite Ansätze zur Kartierung agronomisch wichtiger Merkmale genutzt werden können, um vorteilhafte Allele für die Verbesserung von Elitematerial zu identifizieren.

Das durch Gametenfang erstellte Pflanzenmaterial wurde in mehrortigen Feldversuchen phänotypisiert (Arbeitspaket 2). Dazu wurde Pollen ausgewählter Landrassen auf eine Inzuchtlinie ausgekreuzt. Die so erhaltenen Nachkommen wurden geselbstet. Die Allele der Landrassen spalteten somit in einem einheitlichen genetischen Hintergrund auf. Durch die Erhebung der Pflanzenentwicklung zu verschiedenen Zeitpunkten während der Jugendphase wurden Unterschiede in der Kältetoleranz zwischen den Linien erfasst. Durch Bestimmung der Merkmalskorrelationen wurde geklärt, inwieweit Kältetoleranz, Jugendentwicklung und adulte Merkmale wie der Blühzeitpunkt und die finale Pflanzenhöhe zusammenhängen. Im zweiten Versuchsjahr wurden außerdem umfangreiche Luftbilddaten zur Jugendentwicklung der Pflanzen im Feld mit Hilfe von Drohnen („*unmanned aerial vehicles*“, UAVs) erhoben. Die Auswertung dieser Daten in Verbindung mit klimatischen Faktoren wird die Erstellung von Wachstumsmodellen erlauben. Ein wissenschaftlicher Mitarbeiter im Projekt etabliert derzeit die Analyse im Rahmen einer Kooperation mit Prof. Scott Chapman (University of Queensland / CSIRO, Australien), um die Ergebnisse für das Projekt optimal nutzbar zu machen.

Durch gemeinsame Analyse von phänotypischen und genotypischen Daten wurden durch genomweite Kartierungsansätze Kandidatenregionen für Kältetoleranz-assoziierte Merkmale identifiziert (Arbeitspaket 3). Es wurde außerdem geprüft, inwieweit die genomische Leistungsvorhersage dazu geeignet ist, in genetisch diversem Material Linien zu identifizieren, die für die Erweiterung der genetischen Diversität von Elitematerial und die Einlagerung vorteilhafter Allele für Kältetoleranz genutzt werden können. Um geeignete Strategien für die genombasierte Nutzung nativer Biodiversität in Mais zu entwickeln, wurde der Gametenfang-Ansatz mit Daten eines flankierenden BMBF-geförderten Projektes verglichen, in dem doppelhaploide (DH) Linien aus den gleichen drei Landrassen erstellt wurden.

Mittels bioinformatischer Ansätze wurden Kandidatenregionen im Detail untersucht, um anhand der öffentlich verfügbaren Genomannotation von Mais sowie der Annotation der im Projekt sequenzierten Flint-Linie EP1 Gene zu identifizieren, die mit Kältetoleranz assoziiert sind (Arbeitspaket 4).

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Materialerstellung durch Gametenfang und Phänotypisierung für Kältetoleranz und Jugendentwicklung im Feldversuch

Über einen sogenannten Gametenfang wurden ausgewählte Landrassen auf die kältesensitive Inzuchtlinie F₂ ausgekreuzt, indem die Linie F₂ mit Pollen der jeweiligen Landrassen bestäubt wurde. Die so erhaltenen F₁-Nachkommen wurden zweimal geselbstet, bis S₂-Linien vorlagen, die für die Phänotypisierung eingesetzt wurden. Die Allele aus Landrassen spalten damit in einem einheitlichen genetischen Hintergrund auf (Abbildung 1). Für die Materialerstellung wurden die drei Landrassen Kemater Landmais Gelb (KE), Lalin (LL) und Petkuser Ferdinand Rot (PE) ausgewählt. Diese Landrassen hatten in Vorversuchen genetische Varianz für Kältetoleranz gezeigt und ließen daher auch in den entwickelten S₂-Linien eine Aufspaltung erwarten, die für genetische Analysen genutzt werden kann.

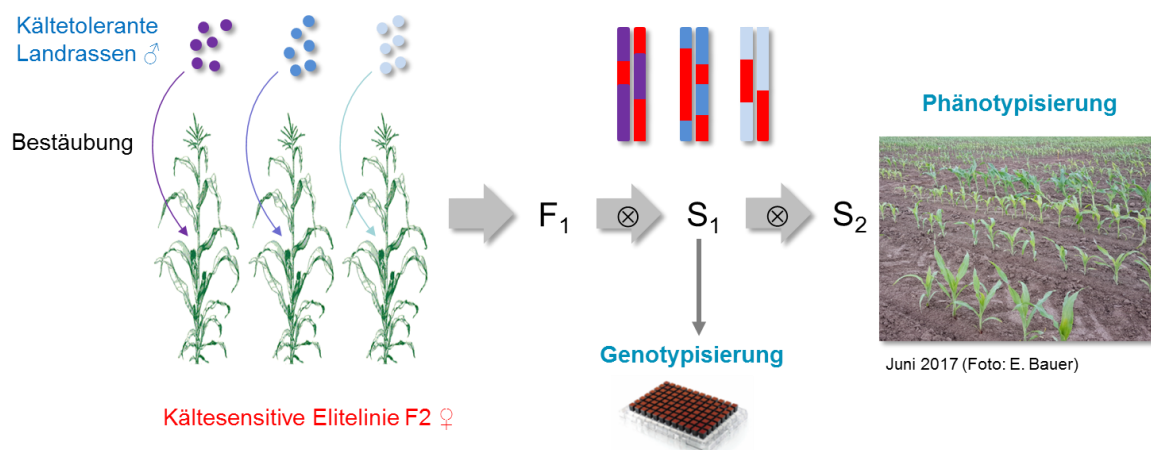


Abbildung 1: Erstellung des Pflanzenmaterials durch Gametenfang. ⊗ symbolisiert Selbstungsschritte zwischen Generationen.

Für Feldversuche 2017 standen insgesamt 958 S₂-Linien aus den drei Landrassen zur Verfügung (Tabelle 1). Vermutlich aufgrund hoher genetischer Bürde lag insbesondere für die aus LL entwickelten Linien nicht ausreichend S₂-Saatgut für das zweite Versuchsjahr (2018) vor. Aus dem Restsaatgut wurde daher eine weitere Selbstung zur Erzeugung von S₃-Linien durchgeführt, die 2018 geprüft werden konnten. Zusammen mit Flint- und Dent-Elitelinien, die als Checks jeweils doppelt geprüft wurden, und den ursprünglichen Landrassen wurden pro Wiederholung 1000 Parzellen geprüft. Der Versuch bestand aus je zehn 10 x 10 unvollständigen Gitteranlagen in zwei Wiederholungen an den Standorten Roggenstein und Einbeck, jeweils in den Jahren 2017 und 2018. Je 3m-Parzelle wurden 20 Körner ausgesät. Die Aussaat fand in Einbeck und Roggenstein am 05.05.2017 bzw. 11.05.2017 sowie am 03.05.2018 bzw. 18.04.2018 statt. Insgesamt wurden im Projekt 8000 Parzellen geprüft. Im Lauf der Vegetationsperiode wurden verschiedene Merkmale zur Erfassung von Jugendentwicklung und Kältetoleranz in verschiedenen Entwicklungsstadien sowie allgemeine agronomische Eigenschaften erhoben (Tabelle 2). Außerdem wurden Klimadaten erfasst (Anhang,

Abbildung A 1). In beiden Jahren gab es nach dem Auflaufen mehrere Kälteepisoden mit Minimaltemperaturen von weniger als 10°C, die zu einer guten Differenzierung des Materials für Kältetoleranz führten.

Tabelle 1: Umfang der Feldversuche (Anzahl Parzellen je Wiederholung) in den Jahren 2017 und 2018 und Aufteilung der Prüfglieder auf die drei Landrassen

Jahr	S ₂ _KE	S ₂ _PE	S ₂ _LL	S ₃ _LL	Checks	Gesamt
2017	288	289	381	-	42	1000
2018	274	269	80	325	52	1000

Tabelle 2: Merkmale im Feldversuch. Die Daten wurden in zwei Jahren an je zwei Orten erfasst, sofern nicht anders vermerkt.

Merkmalsname und Kürzel	Erfassung
Pflanzenzahl STC_V2	Anzahl aufgelaufener Pflanzen („ <i>stand count</i> “), Entwicklungsstadium V2
Early vigor EV_V3, EV_V4 EV_V6	Gesamteindruck der Jugendentwicklung („ <i>early vigor</i> “) pro Parzelle, Bonitur von 1 = schlecht bis 9 = sehr gut in den Stadien V3, V4 und V6
Frühe Wuchshöhe PH_V4 PH_V6	Messung der Pflanzenhöhe („ <i>plant height</i> “) in cm an 5 repräsentativen Einzelpflanzen pro Parzelle in den Stadien V4 und V6
Weibliche Blüte DtSILK	Tage ab Aussaat bis zur weiblichen Blüte („ <i>days to silking</i> “) - Erscheinen der Nabenfäden in 50% der Parzelle
Kolbenansatzhöhe EH	Messung der Kolbenansatzhöhe des obersten Kolbens („ <i>ear height</i> “) in cm (erfasst in Roggenstein 2017, 2018)
Finale Wuchshöhe PH_final	Messung der finalen Pflanzenhöhe in cm bis zum niedrigsten Fahnenast
Abstand Fahne Kolben EarTasDist	Abstand zwischen Fahne und oberstem Kolben („ <i>ear Tas distance</i> “)
Wurzellager RL_R6	Bonitur von 1 = kein Wurzellager („ <i>root lodging</i> “) bis 9 = starkes Wurzellager vor Vollreife (R6)
Bestockung TILL	Bonitur von 1 = keine Bestockungsneigung („ <i>tillering</i> “) bis 9 = starke Bestockungsneigung (erfasst in Roggenstein und Einbeck 2018)
Trockenstress Drought	Bonitur von 1 = keine Trockenstresssymptome („ <i>drought stress</i> “) bis 9 = starke Trockenstresssymptome (erfasst in Einbeck 2018)
Ustilago Ustilago	Bonitur von 1 = kein Befall mit <i>Ustilago maydis</i> bis 9 = starker Befall mit <i>Ustilago maydis</i> (erfasst in Einbeck 2018)

Für alle Merkmale wurden über lineare gemischte Modelle adjustierte Mittelwerte über Orte und Jahre sowie die Heritabilität berechnet (Tabelle 3). Die Berechnung erfolgte nach Ausschluss von sogenannten Ausreißern. Die Heritabilitäten waren allgemein sehr hoch (Ta-

belle 3), was für eine hohe genetische Varianz der untersuchten Merkmale und eine ausgezeichnete Qualität der Daten spricht. Lediglich bei den nur einjährig oder einortig erfassten Merkmalen Bestockung und Ustilagobefall (*Ustilago maydis*, Erreger des Maisbeulenbrands) lagen die Werte mit 0,6 deutlich niedriger. Unter den Merkmalen für die frühe Jugendentwicklung und Kältetoleranz wurde für das objektiv erfassbare Merkmal PH_V4 mit 0,92 die höchste Heritabilität beobachtet. Am Standort Einbeck herrschte während der gesamten Vegetationsperiode 2018 starke Trockenheit, somit konnte die in Landrassen vorhandene Variation für ein weiteres abiotisches Stressmerkmal erfasst werden. Die Aufspaltung in den Linien für Trockenstresssymptome wurde anhand einer Bonitur erhoben, die Heritabilität hierfür betrug 0,87.

Tabelle 3: Heritabilitäten (h^2) innerhalb der Landrassen, bei Lalin getrennt nach S₂- bzw. S₃-Linien, sowie über den Gesamtversuch in den jeweils verfügbaren Umwelten. Für Abkürzungen der Merkmale und Umwelten siehe Tabelle 2.

Merkmal	KE_S ₂	PE_S ₂	LL_S ₂	LL_S ₃	Alle
STC_V2	0,91	0,87	0,89	0,81	0,92
EV_V3	0,86	0,85	0,83	0,85	0,89
EV_V4	0,83	0,83	0,82	0,85	0,88
EV_V6	0,81	0,79	0,82	0,83	0,86
PH_V4	0,88	0,87	0,86	0,90	0,92
PH_V6	0,82	0,82	0,87	0,82	0,88
DtSILK	0,89	0,91	0,88	0,83	0,91
EH	0,89	0,86	0,84	0,86	0,90
PH_final	0,89	0,91	0,89	0,89	0,92
RL_R6	0,56	0,61	0,43	0,67	0,58
TILL	0,58	0,67	0,39	0,41	0,62
Drought	0,78	0,88	0,89	0,86	0,87
Ustilago	0,57	0,57	0,73	0,64	0,64

Anhand der adjustierten Mittelwerte („best linear unbiased estimates“, BLUEs) wurden die Korrelationen zwischen den Merkmalen untersucht (Anhang, Abbildung A 2). Die Merkmale für die frühe Jugendentwicklung (EV_V3, EV_V4, EV_V6, PH_V4, PH_V6) sind mit 0,8-0,9 hoch korreliert. Mit Werten um -0,4 liegt eine moderate negative Korrelation dieser Merkmale mit dem Blühzeitpunkt vor. Dies legt nahe, dass früh blühende Linien tendenziell zwar eine bessere Kältetoleranz haben, jedoch ist die Korrelation nicht sehr hoch. Damit sollte es züchterisch möglich sein, Maismaterial für späte Reifegruppen mit guter Kältetoleranz zu entwickeln. Eine positive Korrelation (0,4-0,5) wurde zwischen den Merkmalen der frühen Jugendentwicklung und der finalen Wuchshöhe beobachtet. Da die Korrelation ebenfalls nur im mittleren Bereich liegt, lässt sich folgern, dass Unterschiede in der frühen Wuchshöhe nur teilweise mit dem genetischen Potential für die finale Wuchshöhe erklärt werden und die Unterschiede in der frühen Wuchshöhe indirekt die Kältetoleranz der Linien erfassen. Die Verteilung der Merkmale Wurzellager und Bestockung zeigt, dass in den züchterisch bisher wenig bearbeiteten Landrassen agronomisch unerwünschte Merkmale aufspalten. Unter starkem

Trockenstress am Standort Einbeck im Jahr 2018 wies ein kleiner Teil der Linien zudem deutliche Trockenstresssymptome, wie z. B. sterile Fahnen, auf. Sollen die vorteilhaften Allele für Kältetoleranz durch Einkreuzung in Elitematerial eingelagert werden, so muss gleichzeitig der Übertragung dieser unerwünschten Merkmale entgegengewirkt werden. Eine Möglichkeit für entsprechende Selektion bietet die genomweite Leistungsvorhersage (siehe Abschnitt 4.4).

Zusätzlich zu den oben beschriebenen Merkmalen wurden Luftbilddaten des Versuchs mittels UAV erhoben, um mit hoher zeitlicher Auflösung die Wachstumsdynamik der Pflanzen zu erfassen. Die Versuche in Roggenstein wurden 2018 ein- bis zweimal wöchentlich an 21 Terminen zwischen Aussaat und Ernte überflogen (Abbildung 2).

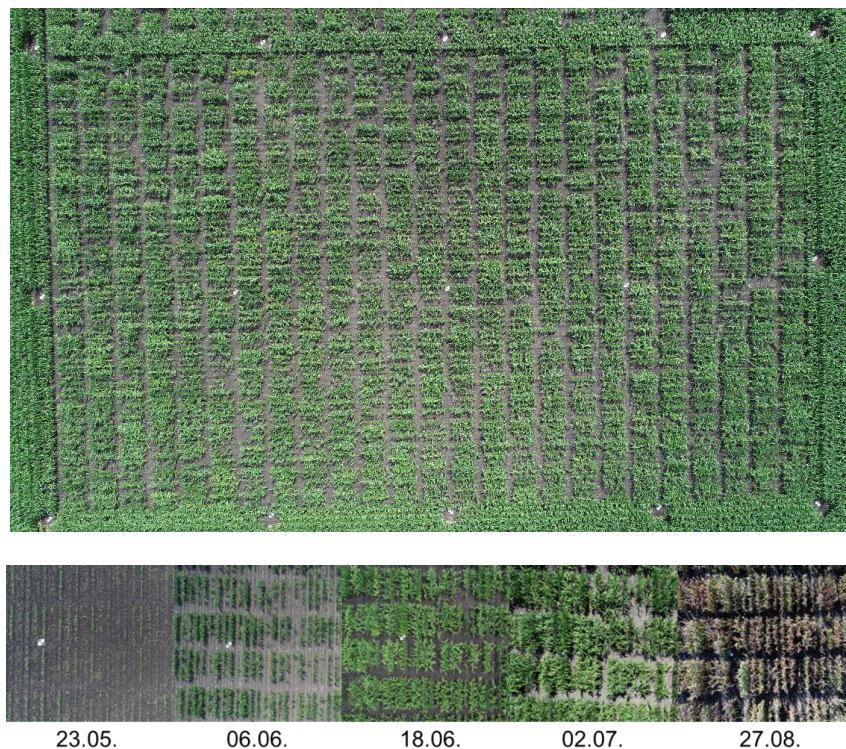


Abbildung 2: Luftbildaufnahmen in Roggenstein 2018 mittels UAV. Oben: Gesamtversuch am 18.06.2018. An den Rändern des Versuchs sowie in der Mitte des Versuchs befinden sich jeweils gemusterte Bodenplatten als Orientierungspunkte für die Auswertung der Drohnenbilder. Unten: Entwicklung der Pflanzen im selben Feldausschnitt an fünf Flugterminen.

Für den Standort Einbeck wurden für 2017 und 2018 entsprechende Daten von KWS zur Verfügung gestellt. Die Auswertung der Luftbilddaten wird gegenwärtig in Zusammenarbeit mit Prof. Scott Chapman (University of Queensland / CSIRO, Australien), durchgeführt. Es sollen Schätzwerte für Pflanzenanzahl, Pflanzenhöhe, Bodenbedeckung und weitere Merkmale ermittelt werden, die als longitudinale Daten für die Erstellung von Wachstumsmodellen genutzt werden können. Im Rahmen der Bilddatenauswertung wird geprüft, inwieweit die digital erhobenen Daten mit den manuell erfassten Daten korrelieren. Bei ausreichend hohen Korrelationen könnten zukünftig die sehr personal- und zeitaufwändigen Datenerfassungen im Feld zumindest teilweise durch Luftbilddaten ersetzt werden. Die zeitlich hochauflösenden Daten sol-

len in Verbindung mit genomweiten Assoziationsstudien die Lokalisierung von relevanten Genomregionen für die Jugendentwicklung der Pflanzen und die Vorhersagegenauigkeit bei der genomweiten Leistungsvorhersage weiter verbessern. Aufgrund der enormen Datenmengen und -komplexität sind Ergebnisse hierzu, auch in Verbindung mit den lokal erhobenen Wetterdaten, erst nach Ende des Projektes zu erwarten.

Das erstellte Pflanzenmaterial der Gametenfang-Linien aus drei europäischen Mais Landrassen und die dazu erhobenen phänotypischen Daten zeigten sowohl das große Potential von Landrassen für die Identifizierung neuer Allele für Kältetoleranz in Mais als auch die mit der Nutzung von genetischen Ressourcen einhergehenden Herausforderungen. Trotz Einlagerung in den genomischen Hintergrund der Inzuchtlinie F2 manifestierte sich die genetische Bürde in Landrassen unter anderem durch geringen Saatgutansatz in einem Teil der Linien. Durch hohen Aufwand bei der Materialerstellung konnte jedoch eine große Zahl von Linien für die Experimente bereitgestellt werden, die intensiv für Kältetoleranz und agronomische Merkmale charakterisiert wurden. Eine Alternative zum Gametenfang besteht in der Produktion von DH-Linien aus Landrassen. Die Ausbeute an DH-Linien ist jedoch stark von der jeweiligen Landrasse abhängig [27]. So gab es beispielsweise für die Landrasse LL in einem flankierenden Projekt erhebliche Schwierigkeiten bei der Produktion von DH-Linien, während das Potential dieser Landrasse über den Gametenfang-Ansatz hier sehr gut abgeschätzt werden konnte. Der züchterische Aufwand für den Gametenfang ist darüber hinaus geringer als für die Erstellung von DH-Linien. Während für das aktuelle Projekt die öffentlich verfügbare Inzuchtlinie F2 verwendet wurde, würden Zuchtunternehmen aktuelle Elitelinien mit einem hohen Leistungsniveau nutzen. Dies könnte bei einer rein phänotypischen Selektion dazu führen, dass Nachkommen bevorzugt werden, die vor allem das Genom des Eliteelters tragen, während Genomregionen aus den Landrassen nicht berücksichtigt würden. Um die züchterisch bisher kaum bearbeiteten Landrassen für die Verbesserung von Elitematerial effizient zu verwenden, sollten daher phänotypische und genotypische Daten genutzt werden, um Genomregionen mit vorteilhaften Allelen der genetischen Ressourcen eindeutig zu identifizieren und diese über genombasierte Züchtung gezielt über weitere Rückkreuzungen in Elitematerial einzulagern. Genombasierte Verfahren erlauben beispielsweise über einen Index die gleichzeitige Selektion gegen unerwünschte Merkmale, wie z. B. Wurzellager oder Bestockung.

4.2 Diversität und populationsgenetische Analysen

Für die Genotypisierung mit dem Affymetrix 600k Maize Genotyping Array [28] wurde die DNA der insgesamt 957 S₁-Linien bzw. für die Landrasse LL zusätzlich auch von 324 S₂-Linien verwendet. Diese repräsentieren den Genotyp der im Feldversuch analysierten S₂- bzw. S₃-Linien. So kann beispielsweise an Genompositionen, die in der S₁-Generation bereits homozygot sind, auch in den S₂-Linien keine Aufspaltung mehr erfolgen, während an heterozygoten Positionen eine 1:2:1 Spaltung in den S₂-Linien erwartet wird. Nach stringenter Qualitätsfilterung der Rohdaten standen ca. 477.000 SNP-Marker für weitere Analysen zur Verfügung. Als Filterkriterien dienten Parameter, wie z. B. die Clusterqualität der Marker, eine zugeordnete Genomposition in der Mais Referenzsequenz sowie die Anforderung, dass ein gegebener Marker in mindestens 90% der Individuen eine Sequenzinformation liefern muss. Für populationsgenetische Analysen und die unten dargestellte Assoziationskartierung wurden Individuen mit

mehr als 10% fehlenden Werten oder mit einer molekularen Zuordnung zur falschen Landrasse aus dem Datensatz entfernt. Es verblieben 922 S_1 -Linien und 324 S_2 -Linien für weitere Analysen.

Die Analyse der Populationsstruktur mittels Hauptkoordinatenanalyse anhand der molekularen Daten zeigt die klare Unterscheidung der Landrassen (Abbildung 3). Erwartungsgemäß finden sich die S_1 - bzw. S_2 - Gametenfang-Linien jeweils zwischen den ursprünglichen Landrassen und der Inzuchtlinie F2. Eine Analyse der molekularen Varianz (AMOVA) der S_1 -Linien ergab, dass 90,8% auf die Variation innerhalb und 9,2% auf die Variation zwischen Landrassen entfallen. Um Elitematerial zu verbessern, sollte es daher möglich sein, einen großen Anteil der allelischen Variation einer Landrasse zu nutzen. Die Vorauswahl von geeigneten Landrassen kann durch Pilotprojekte erfolgen, in denen die genetische Variation innerhalb der Landrassen für das entsprechende Zielmerkmal untersucht wird.

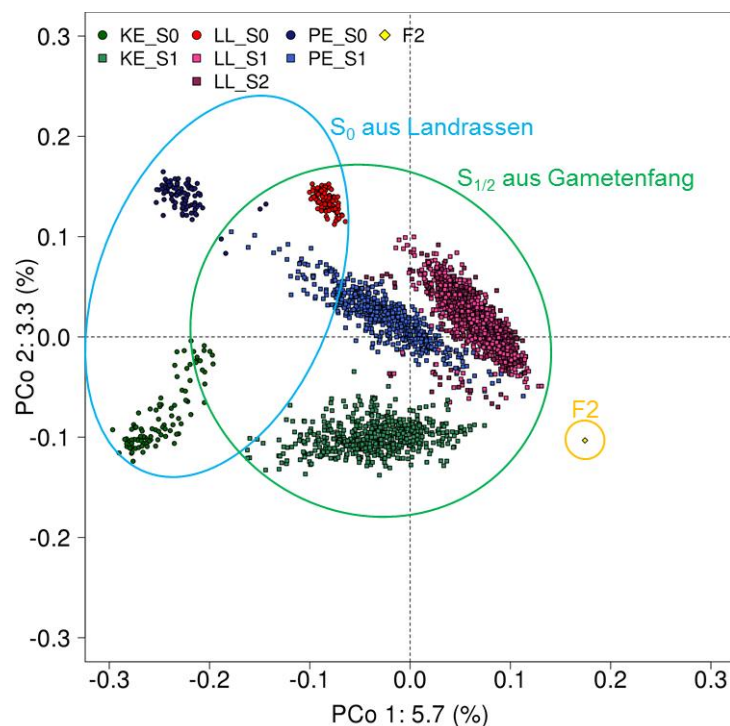


Abbildung 3: Hauptkoordinatenanalyse („*principal coordinate analysis*“, PCoA) basierend auf *Modified Rogers'* Distanzen der ursprünglichen Landrassen (S_0), der S_1 - bzw. S_2 -Linien und der für den Gametenfang verwendeten Inzuchtlinie F2. Der Anteil der durch die beiden ersten Hauptkoordinaten (PCo) erklärten Varianz ist in Klammern angegeben.

Tabelle 4 zeigt Diversitätsparameter der Gametenfang-Linien und der S_0 -Individuen der ursprünglichen Landrassen. Der Anteil polymorpher Marker liegt in den Gametenfang-Linien innerhalb der Landrassen etwas höher als in den ursprünglichen Landrassen. Dies ist bedingt durch Genomregionen, in denen die ursprünglichen Landrassen monomorph waren, die nun aber durch den genetischen Hintergrund der eingekreuzten Linie F2 polymorph sind.

Tabelle 4: Diversitätsparameter in ursprünglichen Landrassen (S_0) und S_1 - bzw. S_2 -Linien. Angegeben sind die Anzahl untersuchter Individuen (n), Anteil polymorpher Marker (PP), Nukleotiddiversität (p) und Haplotypenheterozygotie (H).

	KE_ S_0	KE_ S_1	LL_ S_0	LL_ S_1	LL_ S_2	PE_ S_0	PE_ S_1
n	48	274	48	376	324	47	272
PP	0.73	0.82	0.83	0.89	0.92	0.83	0.87
Pi	0.23	0.23	0.28	0.23	0.22	0.25	0.24
H	0.56	0.57	0.71	0.58	0.60	0.64	0.59

Nukleotiddiversität und Haplotypenheterozygotie liegen in den Gametenfang-Linien teilweise etwas niedriger als in den ursprünglichen Landrassen. Es kann dennoch angenommen werden, dass durch den Gametenfang ein wesentlicher Teil der Diversität der Landrassen repräsentiert ist. Um zu prüfen, ob durch den Gametenfang-Ansatz Haplotypenvielfalt der ursprünglichen Landrassen verloren geht, wurde entlang der Chromosomen die Anzahl verschiedener Haplotypen in ursprünglichen Landrassen (S_0) und S_1 -Linien bestimmt (Abbildung 4). Die Haplotypen wurden anhand einer LD-basierten Methode [29] berechnet. Der Großteil der in den S_0 -Individuen vorhandenen Haplotypen konnte auch in den S_1 -Linien wiedergefunden werden. Geringe lokale Unterschiede könnten auch auf verschiedene Stichprobengrößen zwischen S_0 und S_1 zurückzuführen sein. Systematische Unterschiede in der Haplotypenanzahl für bestimmte Genomregionen wurden nicht beobachtet. Die Gametenfang-Linien eignen sich daher hervorragend, um die native Diversität und Haplotypenvielfalt aus diesen Landrassen züchterisch nutzbar zu machen.

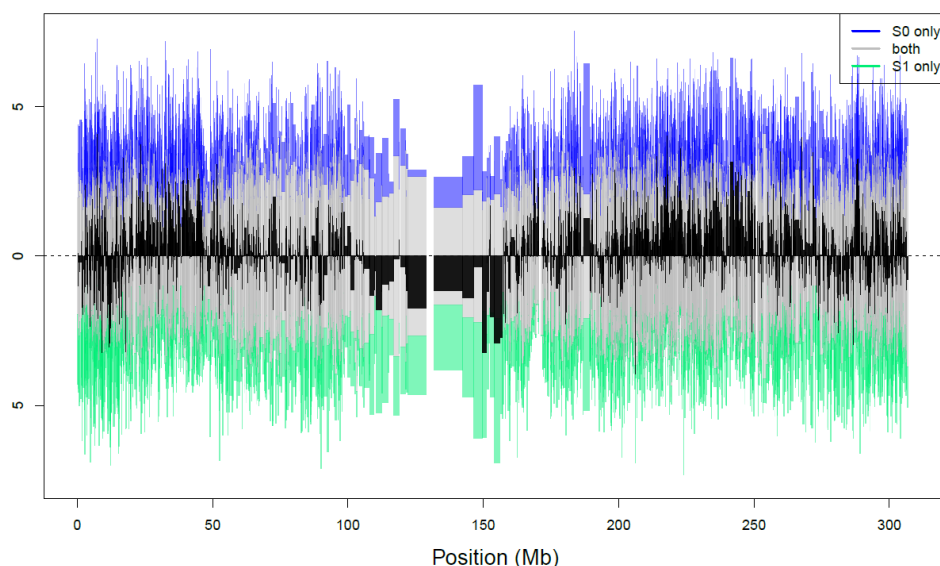


Abbildung 4: Anzahl von Haplotypen in S_1 Gametenfang-Linien im Vergleich zur ursprünglichen Landrasse (S_0) Lalin, exemplarisch dargestellt für Chromosom 1. Haplotypen, die nur in S_0 auftreten: blau (oben), nur in S_1 : grün (unten), in S_0 und S_1 : grau (symmetrisch). Schwarz: Differenz der Haplotypenanzahl zwischen S_0 und S_1 (Überschuss S_0 : oben, S_1 : unten).

4.3 Lokalisierung von Genomregionen für Kältetoleranz und Jugendentwicklung

Zur Lokalisierung von Genomregionen, welche die Merkmale Kältetoleranz und Jugendentwicklung beeinflussen, wurde ein assoziationsgenetischer Ansatz verwendet. Anhand phänotypischer und genotypischer Daten wurden genomweit Assoziationen zwischen molekularen Markern und der phänotypischen Merkmalsausprägung detektiert. Sowohl über Landrassen hinweg als auch innerhalb von Landrassen wurde die vorhandene Populationsstruktur in der Analyse berücksichtigt. Abbildung 5 zeigt exemplarisch einen Manhattan-Plot für das Merkmal Frühe Wuchshöhe im Entwicklungsstadium V4. In zwei Genomregionen auf Chromosom 1 und einer Region auf Chromosom 4 wird der Schwellenwert überschritten.

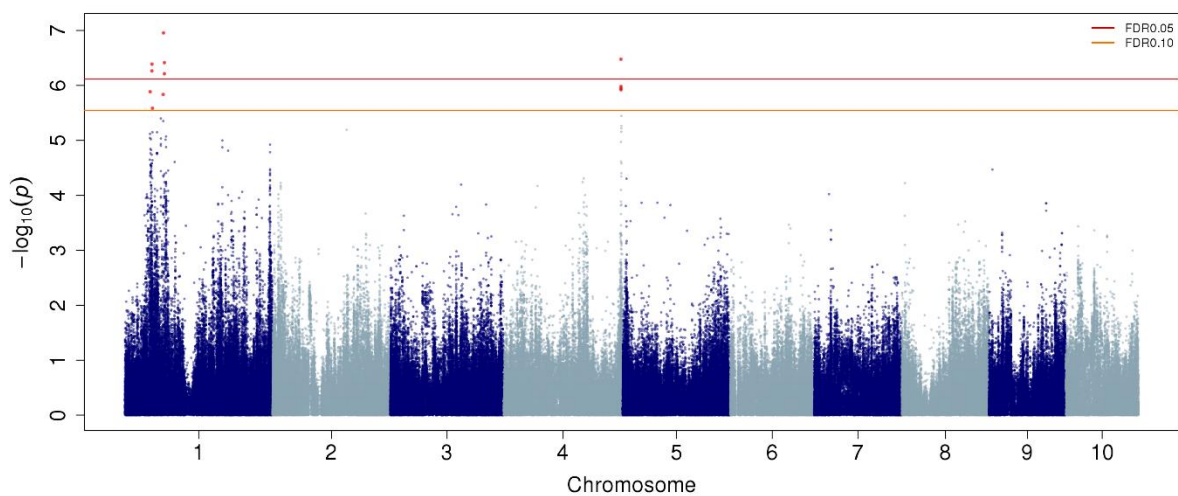


Abbildung 5: Genomweite Assoziationsstudie für das Merkmal Frühe Wuchshöhe (PH_V4) über alle drei Landrassen unter Berücksichtigung der Populationsstruktur mittels K-Matrix. Der Manhattan-Plot zeigt auf der x-Achse die zehn Mais-Chromosomen und auf der y-Achse den negativen dekadischen Logarithmus des p-Werts aus der Assoziationsanalyse. Die roten und orangen Linien kennzeichnen das Signifikanzniveau für eine „false discovery rate“ (FDR) von 5% bzw. 10%.

Die Analyse über alle Landrassen hinweg zeigt weitere Genomregionen, die mit den verschiedenen Merkmalen für die frühe Jugendentwicklung bzw. mit agronomischen Merkmalen assoziiert sind (Abbildung 6). Werden die Landrassen einzeln betrachtet, wird deutlich, dass auch Regionen spezifisch in einzelnen Landrassen segregieren, die ebenfalls für die züchterische Verbesserung der Kältetoleranz genutzt werden können (Anhang, Abbildung A 3).

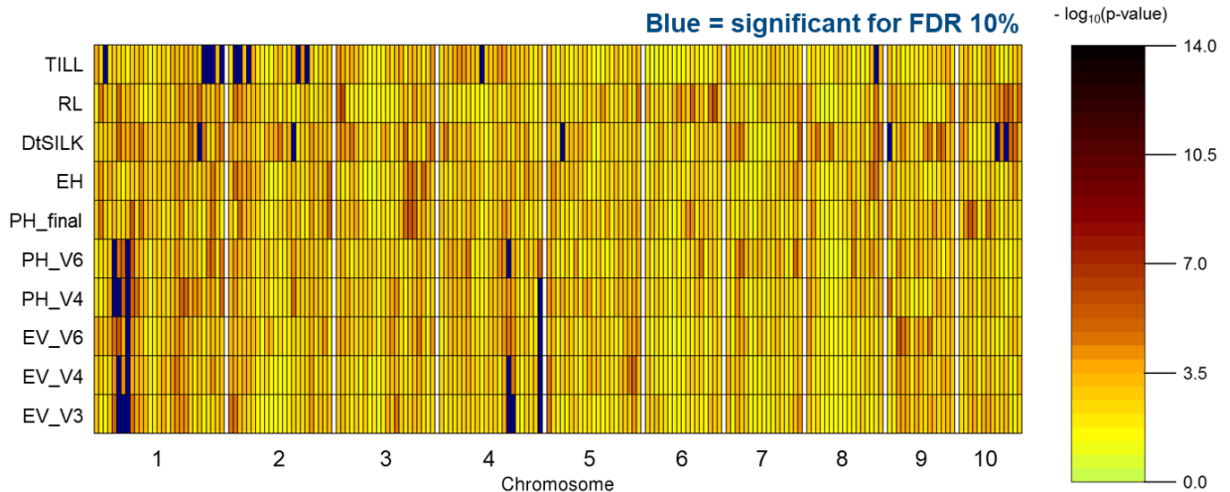


Abbildung 6: Genomweite Assoziationsstudie über alle drei Landrassen für frühe Jugendentwicklung und weitere agronomische Merkmale (siehe Tabelle 2). Die Darstellung zeigt für 20 Mb Fenster entlang der zehn Mais-Chromosomen den negativen dekadischen Logarithmus des p-Werts des signifikantesten Markers je Fenster. Blau eingefärbte Fenster überschreiten den Grenzwert für eine „false discovery rate“ (FDR) von 10%.

Die Vielzahl der Genomregionen für Kältetoleranz und Jugendentwicklung unterstreicht die genetische Komplexität dieser Merkmale. Während sich einige Regionen aus der Assoziationskartierung relativ scharf abgrenzen lassen und nur wenige Kandidatengene enthalten, liegt in anderen Regionen eine Vielzahl von Genen, was die Identifizierung von Kandidatengenen erschwert. In den signifikant mit einzelnen Merkmalen assoziierten Genomregionen werden anhand der Mais Genomannotationen der Dent Referenzlinie B73 und der im Projekt sequenzierten Flint-Linie EP1 (siehe Abschnitt 4.5) sowie mittels der Zuordnung zu Genontologien („gene ontologies“, GO) für biologische, molekulare und zelluläre Funktionen relevante Kandidatengene für Kältetoleranz identifiziert. Für diese Kandidatengene werden die Allele aus Landrassen mit Elitematerial verglichen, um bisher züchterisch nicht genutzte Allele zu finden. Damit können neue Haplotypen mit positivem Effekt auf Kältetoleranz identifiziert werden, die markerbasiert in Elitematerial eingelagert werden können und damit zu einer Verbesserung der Kältetoleranz in Mais beitragen. Die Auswertung und Filterung der Daten ist derzeit noch nicht abgeschlossen.

4.4 Genomische Leistungsvorhersage

Die Vorhersage genomischer Zuchtwerte basiert auf der Verwendung phänotypischer und genomweiter genotypischer Daten einer Trainingspopulation, anhand derer über geeignete statistische Modelle die allelischen Effekte für alle untersuchten Marker geschätzt und aufsummiert werden [30]. Die so geschätzten Effekte können zur Leistungsvorhersage in genotypisierten, aber nicht phänotypisierten Individuen (Testpopulation) verwendet werden. Die Vorhersagegenauigkeit hängt von verschiedenen Faktoren ab, wie z. B. der Verwandtschaft zwischen Trainings- und Testpopulation, der Größe der Trainingspopulation, dem Ausmaß

des LD und der Heritabilität des Merkmals. Sie unterscheidet sich außerdem selbst bei ähnlich hoher Heritabilität zwischen Merkmalen. Während der Einsatz der genomischen Leistungsvorhersage in Elitezuchtprogrammen seit einigen Jahren im Mais etabliert ist [31, 32], wurde der Einsatz der Methode in genetischen Ressourcen bisher kaum untersucht. Gerade bei der Einlagerung neuer genetischer Variation aus genetischen Ressourcen könnte die Methode jedoch durch Reduzierung der Phänotypisierungskosten und Verkürzung von Zuchtzyklen einen entscheidenden Vorteil bieten [33, 34]. Zunächst stellte sich hierbei die Frage, wie groß entsprechende Trainingspopulationen gewählt werden müssen, um ausreichend zuverlässige Vorhersagen zu treffen. Hierfür wurden Berechnungen mit verschiedenen Stichprobengrößen zwischen $N = 50$ und $N = 350$ durchgeführt (Abbildung 7). In allen Landrassen ist abhängig vom Stichprobenumfang ein Anstieg der Vorhersagegenauigkeit zu beobachten. Der stärkste Anstieg war bis $N = 200$ zu verzeichnen, doch auch darüber hinaus stiegen die Vorhersagegenauigkeiten weiter an und erreichten in keinem Fall ein Plateau. Daraus kann geschlossen werden, dass in vergleichbaren genetischen Ressourcen Trainingspopulationen von mindestens 200 Individuen verwendet werden sollten. Abbildung 7 und Tabelle 5 zeigen außerdem, dass sich die Vorhersagegenauigkeiten für die verschiedenen Merkmale unterscheiden. Während die mit Kältetoleranz assoziierten Merkmale der frühen Jugendentwicklung bei einheitlicher Stichprobengröße von $N = 250$ bei der Vorhersagegenauigkeit zwischen 0,2 und 0,4 lagen, wurden für die späten Merkmale wie Blüte, Kolbenansatzhöhe und finale Wuchshöhe Werte um 0,5 beobachtet. Mit am besten wurde das Merkmal Bestockung vorhergesagt. Vorhersagegenauigkeiten zwischen Landrassen liegen bei 0 (Daten nicht gezeigt). Vorhersagen über Landrassen hinweg sind daher, vermutlich aufgrund der stark unterschiedlichen Kopplungsphasen, nicht möglich.

In einem flankierenden Projekt wurden Versuche mit DH-Linien aus den gleichen drei Landrassen durchgeführt. Im Schnitt lagen die Vorhersagegenauigkeiten dort etwas höher als in den Gametenfang-Linien. Ein möglicher Grund hierfür ist, dass in den noch teilweise heterozygoten Gametenfang-Linien nicht die volle genetische Varianz aufspaltet. Die verwendeten statistischen Modelle berücksichtigten in unseren Analysen zudem nur die additiv-genetische Varianz, jedoch keine Dominanzeffekte, da diese für die Selektion von untergeordneter Bedeutung sind. Aufgrund der etwas heterogeneren Bestände sind Phänotypen in den Gametenfang-Linien außerdem mit etwas geringerer Präzision zu erfassen als in homozygoten und homogenen Beständen von DH-Linien. Wie weiter oben (Abschnitt 4.2) bereits ausgeführt, bietet der Gametenfang-Ansatz jedoch den Vorteil, dass das Material schneller und einfacher zu erstellen ist. Mit anschließender stringenter Selektion, basierend auf genomischen Zuchtwerten, können aus einer großen Anzahl von Linien die besten ausgewählt werden. Es muss untersucht werden, ob eine weitere Optimierung der genomischen Leistungsvorhersage und damit eine verbesserte Selektion auf Kältetoleranz anhand multivariater Methoden [35] erzielt werden kann. Dabei werden mehrere Merkmale gleichzeitig betrachtet und genetische Netzwerke bzw. Interaktionen können berücksichtigt werden.

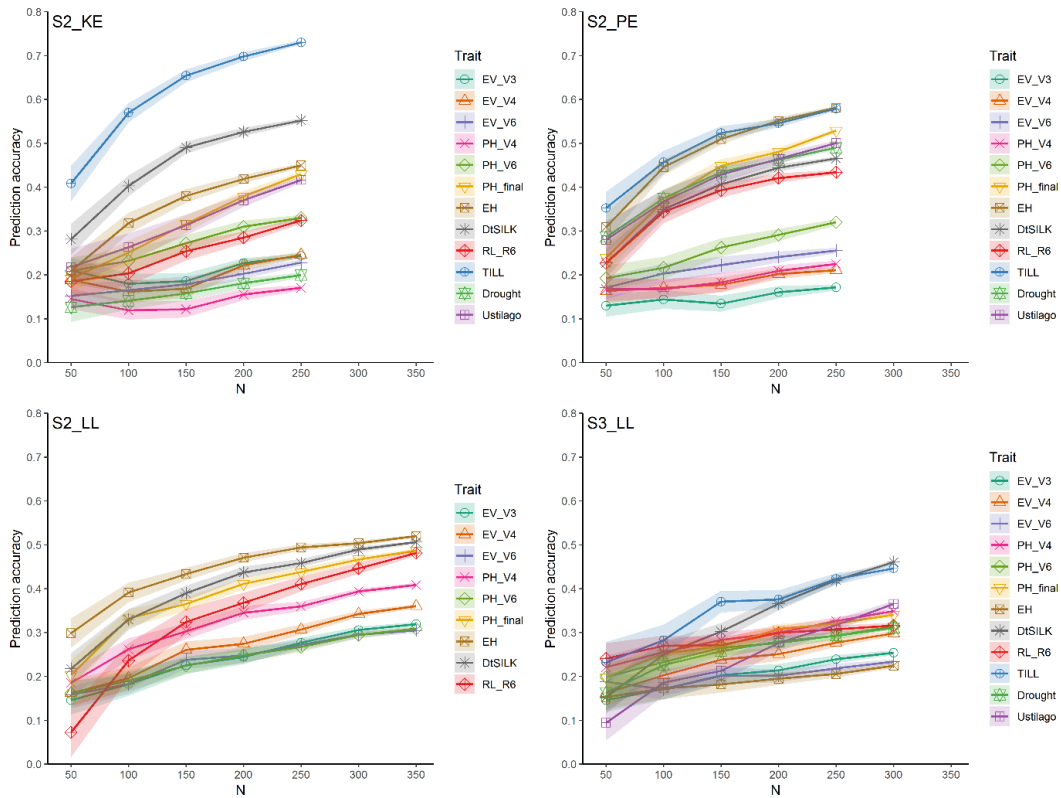


Abbildung 7: Genomweite Leistungsvorhersage für frühe Jugendentwicklung und weitere agronomische Merkmale („*Trait*“, siehe Tabelle 2) über alle drei Landrassen. Für die Landrasse LL sind die Ergebnisse getrennt dargestellt für S₂- bzw. S₃-Linien und beruhen auf einjährigen Daten. Die Abhängigkeit der Vorhersagegenauigkeit („*prediction accuracy*“, y-Achse) von der Stichprobenzahl (N, x-Achse) wurde jeweils anhand von 100 zufälligen Stichproben und zehnmaliger 5-facher Kreuzvalidierung ermittelt. Schattierte Bereiche: Konfidenzintervall der wiederholten Stichproben.

Tabelle 5: Vorhersagegenauigkeit in der genomischen Leistungsvorhersage für verschiedene Merkmale (siehe Tabelle 2) in S₂- bzw. S₃-Linien der drei Landrasen. Die angegebenen Mittelwerte basieren auf 100 Stichproben von N = 250 Individuen mit zehnmaliger 5-facher Kreuzvalidierung je Stichprobe.

Merkmal	S2_KE	S2_PE	S2_LL	S3_LL
EV_V3	0,24	0,17	0,28	0,24
EV_V4	0,25	0,21	0,31	0,28
EV_V6	0,23	0,26	0,27	0,22
PH_V4	0,17	0,22	0,36	0,33
PH_V6	0,33	0,32	0,27	0,29
DtSILK	0,55	0,47	0,46	0,42
EH	0,45	0,58	0,49	0,21
PH_final	0,43	0,53	0,44	0,32
RL_R6	0,32	0,43	0,41	0,31
TILL	0,73	0,58	-	0,42
Drought	0,20	0,49	-	0,29
Ustilago	0,42	0,50	-	0,31

4.5 Erstellung einer *de novo* Referenzsequenz für Flint

Vor dem Hintergrund ausschließlich Dent-spezifischer öffentlicher Mais-Referenzgenome (B73, PH207) sowie der großen Bedeutung von Flint-Linien in der europäischen Maiszüchtung, speziell für das Merkmal Kältetoleranz, wurde im Rahmen des Projektes die Flint-Linie EP1 für die Erstellung einer *de novo* Genomsequenz ausgewählt. EP1 repräsentiert die genotypische Basis vieler moderner Elitelinien in Europa. Insgesamt wurden 768 Gb genomische Sequenzdaten für EP1 unter Verwendung der Illumina Plattform mit 320-facher Genomabdeckung erzeugt und mithilfe der *DeNovoMagic*TM Pipeline der Firma NRGene zu Pseudochromosomen assembliert. Die hohe Qualität und Kontiguität des Assemblies spiegelt sich in ausgezeichneten Genomstatistiken, wie z. B. einem N50 Wert von 6,1 Mb (siehe Tabelle 6), wider.

Zur weiteren Charakterisierung der Genomsequenz wurden unter Verwendung einer Mais-Repeatdatenbank [36] die Repeat- und Transposonregionen des Genoms detektiert und annotiert. Entsprechend des hohen Transposonanteils im Maisgenom sind ~80% der genomischen Sequenz in EP1 repetitiver Natur. Insgesamt wurden >1,34 Millionen Transposonverwandte Elemente in EP1 gefunden, wobei der überwiegende Anteil (92%) den Klasse I Repeats (Retrotransposons) angehört.

Tabelle 6: Kennzahlen des EP1 Referenzgenom-Assemblies

Genomstatistik	Wert
Sequenz [bp]	2.462.913.883
Anzahl Scaffolds	71.196
Assembly Lücken [bp]	25.361.986
Assembly Lücken [%]	1,03
N50 [bp]	6.134.294
N90 [bp]	1.226.172
Maximale Scaffoldlänge [bp]	29.676.303

Die Vorhersage der Genfunktionen mittels bioinformatischer Methoden (sog. Annotation) basierte auf Konsensusmodellen von transkriptionellen Evidenzen und Proteinhomologien verwandter Spezies (*Brachypodium*, Reis und Hirse) sowie öffentlicher Genannotationen der Mais-Linien PH207 und B73. Sowohl die Referenzsequenz als auch die Repeat- und Genannotation wurden über Datenbanken öffentlich verfügbar gemacht. Zur Aufklärung struktureller Variation zwischen Maisgenomen wurden „whole genome alignments“ (WGAs) zwischen sechs Mais Referenzgenomen durchgeführt. Es konnten vier Flint- (EP1, F7, DK105, PE0075) und zwei Dent- (B73, PH207) Referenzsequenzen verglichen werden. Die WGAs wurden mithilfe des Programms *MUMmer* [37] als paarweise Sequenzvergleiche aller zehn Pseudochromosomen berechnet und zeigten in allen Vergleichen mit anderen Referenzgenomen eine Vielzahl struktureller Unterschiede wie Deletionen, Insertionen, Inversionen und Translokationen, die sich über mehrere Kilobasen bis hin zu mehreren Megabasen erstrecken und von denen auch zahlreiche Gene betroffen sind. Zentrale Ergebnisse der Studie sind die Identifizierung von Flint- und Dent-spezifischen genomischen Regionen sowie des Coregenoms, das in allen sechs Linien alignierbar ist. Interessanterweise korreliert dieses stärker mit centromer-nahen Regionen bzw. Regionen mit niedriger Rekombination (Abbildung 8).

Die Vielzahl struktureller Rearrangements sowie Unterschiede in den annotierten Genen zwischen Dent-Linien und der hier erstellten Flint Referenzsequenz unterstreichen die Bedeutung der EP1 Genomressource für das Projekt BayKlimaFit und für die europäische Maisforschung und –züchtung. In BayKlimaFit ist die EP1 Referenzsequenz von großer Relevanz für die Berücksichtigung Flint-spezifischer struktureller Varianten. Da in EP1 Genmodelle identifiziert wurden, die in der bisher verwendeten Dent Referenzsequenz der Dent-Linie B73 nicht vorhanden sind, ist eine genauere Identifizierung und Charakterisierung von Kandidatengenomen möglich, die mit Kältetoleranz assoziiert sind. Eine detaillierte Analyse der Genomregionen für Kältetoleranz, die in GWAS Analysen identifiziert wurden (siehe Abschnitt 4.3), wird derzeit durchgeführt.

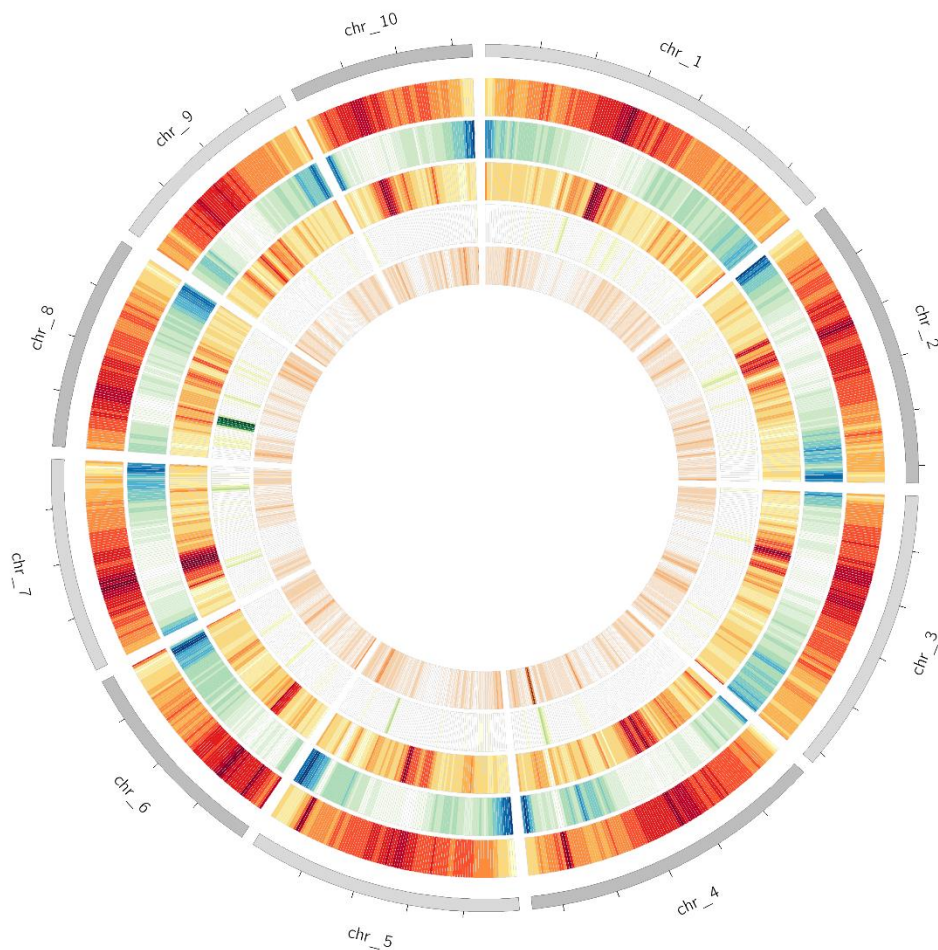


Abbildung 8: Dichte verschiedener genetischer Elemente im Genom der Flint-Linie EP1. Das Kreisdiagramm zeigt von außen nach innen für die Chromosomen 1 bis 10: Repeatdichte, Gendichte, Anteil des Coregenoms, Dichte gruppenspezifischer (Flint/Dent) Regionen und nicht-alignierter Bereiche. Dunklere Farben stehen jeweils für eine höhere Dichte. Deutlich erkennbar sind die hohen Repeat- und Coregenom-Dichten (1. und 3. Kreis) in den inneren, centromernahen Regionen der Chromosomen. Im Gegensatz dazu konzentrieren sich die Gene (2. Kreis) in den telomernahen, randständigen chromosomalen Abschnitten.

4.6 Bioinformatische Analysen für den Projektverbund BayKlimaFit

Transkriptomanalyse der Entwicklung von Maispollen

In Zusammenarbeit mit dem Partner Universität Regensburg (Teilprojekt 4) wurden RNAseq-Daten von Maispollen in vier Entwicklungsstadien (uni-, bi-, trizelluläres und Tetradenstadium) analysiert, um anhand differentiell exprimierter Gene (DEG) die beteiligten biologischen Prozesse und Schlüsselgene zu identifizieren. Die DEG-Kalkulation der vier Entwicklungsstadien basierte auf einer Zeitreihenanalyse und wurde bezüglich eines Referenzwertes (Tetradenstadium) wie auch für direkt aufeinanderfolgende Stadien ermittelt. Die Zahl der statistisch signifikanten DEGs war dabei in beiden Fällen sehr hoch und lag für die Summe

hoch- und herunterregulierter Gene bei ca. 50% der Gesamtanzahl in Mais. In der Gruppe der DEGs, die in allen Kontrasten differentiell exprimiert waren, wurden Komponenten des Cytoskeletts und mit diesem interagierende Proteine sowie Enzyme des Lipidmetabolismus in signifikant erhöhter Anzahl detektiert. Zusätzlich wurde eine Liste angereicherter Transkriptionsfaktoren für eine Detailanalyse erstellt. Für die Detektion biologisch relevanter funktionaler Module für die Pollenentwicklung in Mais und maßgeblicher Schlüsselgene wurde ein Clustering der Zeitreihe sowie eine Netzwerkanalyse gewichteter Gen-Coexpressionen durchgeführt (Anhang, Abbildung A 4). Anhand der Präsenz eines Gens innerhalb eines Moduls sowie der Signifikanz seines Expressionsprofils und der Modulsignifikanz selbst wurden dem Kooperationspartner Schlüsselgene aufgezeigt. Für Details siehe Bericht zu Teilprojekt 4 der Universität Regensburg.

Transkriptomanalyse hitzebehandelter Maispollen

Vom Partner Universität Regensburg (Teilprojekt 4) wurde RNA von Maispollen im Tetradenstadium sequenziert, die für 48 Stunden mäßigem Hitzestress bzw. Normaltemperatur ausgesetzt waren. Die Sequenzdaten zeigten eine sehr gute Qualität und waren frei von Ausreißern und Batch-Effekten und der Hitzestress bedingte deutlich die größte Varianz des Datensatzes (Anhang, Abbildung A 5). Insgesamt wurden 169 hochregulierte und 130 Gene mit signifikant niedrigerer Expression in gestresstem Pollen identifiziert. Die Ergebnisse wurden dem Kooperationspartner Uni Regensburg zur weiteren Auswertung übergeben. Für Details siehe Bericht zu Teilprojekt 4 der Universität Regensburg.

Transkriptomanalyse zur Stomataregulation in Gerste

Zusammen mit dem Partner Universität Würzburg (Teilprojekt 7) wurden zur Identifizierung von Genen, die an der Stomatabewegung beteiligt sind, in einer ersten Pilotstudie RNAseq-Daten von intakten Blättern der unteren Epidermis mit intakten Stomata Komplexen sowie Blättern ohne Epidermis analysiert. Diese Daten wurden im Rahmen einer differentiellen Transkriptionsanalyse und mit Hilfe der genomischen Referenzdaten für Gerste [38] ausgewertet. Dabei wurden an der Stomatabewegung beteiligte Gene in Gerste mit ihren Homologen aus *Arabidopsis* identifiziert. Es wurde geprüft, ob Transkripte dieser Gene im Komplex aus Schließ- und Nebenzellen oder in Blättern ohne Schließzellen angereichert sind. Es konnten wesentliche Komponenten des ABA-induzierten Stomaschlusses identifiziert und dem Schließzell-/Nebenzellkomplex zugeordnet werden [39]. Die Analyse wurde im letzten Jahr mit einem erweiterten Transkriptom-Datensatz und mit den aktuellen genomischen Referenzdaten in Gerste wiederholt. Dazu wurden verschiedene Pipelines und Werkzeuge zur Analyse der Transkriptomdaten getestet sowie die Rohdaten evaluiert. Die Auswertung der Ergebnisse, u. a. auch mit Hilfe ihrer funktionalen Annotation („*gene ontology*“, GO), ist nahezu abgeschlossen. Für Details siehe Bericht zu Teilprojekt 7 der Universität Würzburg.

4.7 Voraussichtlicher Nutzen und Einordnung der Projektergebnisse mit Bezug zum Klimawandel

Der Klimawandel erfordert geeignete Anpassungsstrategien, um eine nachhaltige und ressourcenschonende landwirtschaftliche Produktion zu sichern. Im Bereich der Pflanzenproduktion sind dabei vor allem verschiedene abiotische Stressfaktoren relevant, denen durch angepasste Produktionstechnik sowie Anbau und Züchtung stresstoleranter Kulturarten begegnet werden kann [40]. Aus der Kombination aus veränderten Niederschlagsverteilungen mit teilweise länger anhaltenden Trockenheitsphasen im Sommer sowie steigenden Temperaturen ergeben sich für viele Kulturarten neue Herausforderungen. Insbesondere während der Blüte reagieren Kulturarten wie Getreide und Mais sehr empfindlich auf Trockenstress. Durch Verschiebung der Vegetationsperiode hin zu früherer Reife können die Folgen der Sommertrockenheit abgemildert werden. Soll die Vegetationsperiode zur Vermeidung von Ertragsausfällen nicht lediglich durch Anbau frühblühender Sorten verkürzt werden, bietet sich beispielsweise für den Mais an, frühere Aussaattermine zu wählen. Da Mais jedoch eine wärmeliebende Pflanze tropischen Ursprungs ist, setzt dies ausreichende Kältetoleranz und eine rasche Jugendentwicklung der Jungpflanzen im Frühjahr voraus. Während im Elitezuchtmaterial nur wenig genetische Variation für Kältetoleranz vorhanden ist, stellen Mais Landrassen mit ihrer breiten genetischen Variation ein natürliches Reservoir allelischer Diversität dar. Die züchterische Verwendung von genetischen Ressourcen steht vor der Herausforderung, günstige Allele für Merkmale wie Stresstoleranz in Elitematerial einzulagern unter gleichzeitiger Vermeidung der genetischen Bürde. Aufgrund bisher fehlender Konzepte zur effizienten Nutzung genetischer Ressourcen, insbesondere für komplex vererbte Merkmale wie Kältetoleranz, ist deren native Diversität züchterisch bisher kaum gezielt nutzbar. Im Rahmen des Projektes wurde das Konzept des Gametenfangs aus Mais Landrassen evaluiert, um Genomregionen in Mais zu identifizieren, die die Kältetoleranz und Jugendentwicklung in Mais positiv beeinflussen. Die detaillierte genotypische und phänotypische Charakterisierung von Gametenfang-Linien aus drei europäischen Mais Landrassen ermöglichte die Identifizierung von Genomregionen, die mit Kältetoleranz und Jugendentwicklung assoziiert sind. Durch genombasierte Züchtungsverfahren kann neue genetische Variation für die Züchtung verbesserter stresstoleranter Sorten zugänglich gemacht werden. Die Kooperation mit einem Wirtschaftspartner gewährleistet die schnelle Umsetzung der gewonnenen Erkenntnisse in die Praxis in Form neuer und klimaangepasster Sorten.

5 Veröffentlichungen im Rahmen des Projekts

Publikationen in begutachteten Zeitschriften:

Mayer M, Unterseer S, Bauer E, de Leon N, Ordas B, Schön C-C (2017) Is there an optimum level of diversity in utilization of genetic resources? Theor Appl Genet 130:2283-2295
<https://doi.org/10.1007/s00122-017-2959-4>

Blankenagel S, Yang Z, Avramova V, Schön C-C, Grill E (2018) Generating plants with improved water use efficiency. Agronomy 8:194 <https://doi.org/10.3390/agronomy8090194>

Publikationen in Vorbereitung:

Eine Publikation zum genomweiten Vergleich der Referenzgenome von vier Flint- und zwei Dent-Linien ist zusammen mit dem Helmholtz Zentrum München in Vorbereitung.

Ergebnisse zur genomweiten Leistungsvorhersage im Vergleich von Gametenfang-Linien und doppelhaploiden Linien aus Landrassen werden an der TUM für eine Publikation aufbereitet.

Publikationen in Zeitschriften ohne Review-Verfahren bzw. in Datenbanken:

Die in BayKlimaFit erstellte erste Genomreferenzsequenz für eine Flint Maislinie (EP1) wurde im Februar 2017 zusammen mit der Arbeitsgruppe von Klaus F.X. Mayer (Helmholtz Zentrum München, HMGU) über die Maize Genomics Database (MaizeGDB, <http://www.maizegdb.org/>) und das National Center for Biotechnology Information (NCBI, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) unter dem sogenannten Toronto Agreement [41] zugänglich gemacht und steht seit 01.10.2018 der wissenschaftlichen Gemeinschaft frei zur Verfügung. Eine Vorveröffentlichung erschien auf der Plattform bioRxiv:

Unterseer S, Seidel MA, Bauer E, Haberer G, Hochholdingner F, Opitz N, Marcon C, Baruch K, Spannagl M, Mayer KFX, Schön C-C (2017) European Flint reference sequences complement the maize pan-genome. bioRxiv <https://doi.org/10.1101/103747>

Vorträge:

Schön, C.-C., Bauer E. (2016): Verbesserung der Kältetoleranz von Mais. Auftaktveranstaltung PV BayKlimaFit, München, 14.04.2016

Bauer E (2017) Anpassung von Nutzpflanzen an den Klimawandel - Einsatz moderner Züchtungsmethoden. 8. Agrarwissenschaftliches Symposium, Freising, 21.09.2017

Schön, C.-C., Bauer, E., Mayer, M. (2017): Verbesserung der Kältetoleranz von Mais. Zwischenbilanz und Fachtagung PV BayKlimaFit, Martinsried, 09.10.2017

Mayer M (2017) Strategien zur Nutzung genetischer Ressourcen in der Maiszüchtung. GFPI-Jahrestagung, Berlin, 08.11.2017 (eingeladener Vortrag)

Schön C-C (2018) Grüne Biotechnologie – Chancen und Zukunftsperspektiven.- Vortragsreihe „TUM@Freising: Wissenschaft erklärt für alle“, Freising, 06.02.2018

Schön, C.-C. (2018): Main drivers of genomic prediction accuracy in plant population. German Plant Breeding Conference, Wernigerode, 1.03.2018

Bauer E (2018) *De novo* reference assembly and annotation of Flint lines EP1, F7, DK105, PE0075. MGC Workshop Maize Genomes, 60th Annual Maize Genetics Conference 2018, St. Malo, Frankreich, 22.03.2018 (eingeladener Vortrag)

Spannagl, M. (2019): European flint genomes complementing the maize pan- and core-genome.- Plant and Animal Genome Conference, San Diego, USA, 12.01.2019

Posterpräsentationen:

Schön, C.-C., Bauer E. (2016): Verbesserung der Kältetoleranz von Mais. Auftaktveranstaltung PV BayKlimaFit, München, 14.04.2016

Mayer M, Unterseer S, Bauer E, de Leon N, Ordas B, Schön C-C (2016) Genetic potential of European maize landraces. 5th International Conference on Quantitative Genetics (ICQG), Madison, Wisconsin, USA, 12.-17.06.2016

Unterseer S, Seidel M, Bauer E, Haberer G, Hochholdinger F, Opitz N, Marcon C, Baruch K, Spannagl M, Mayer KFX, Schön C-C (2017) European Flint reference sequences complement the maize pan-genome. 59th Annual Maize Genetics Conference, St. Louis, USA, 09.-12.03.2017

Unterseer S, Seidel M, Bauer E, Haberer G, Hochholdinger F, Opitz N, Marcon C, Baruch K, Spannagl M, Mayer KFX, Schön C-C (2017) European Flint reference sequences complement the maize pan-genome. European Molecular Maize Meeting, Gent, Belgien, 03.-05.05.2017

Schön, C.-C., Bauer, E., Mayer, M. (2017): Verbesserung der Kältetoleranz von Mais. Zwischenbilanz und Fachtagung PV BayKlimaFit, Martinsried, 09.10.2017

Bauer E, Haberer G, Seidel M, Gundlach H, Hochholdinger F, Marcon C, Baruch K, Spannagl M, Mayer KFX, Schön C-C (2018) Four European Flint reference sequences complement the maize pan-genome. 60th Annual Maize Genetics Conference 2018, St. Malo, Frankreich, 22.-25.03.2018, P8

Muth P, Bauer E, Schön C-C, Gutjahr J (2018) Influence of arbuscular mycorrhiza on stress resilience in a European maize diversity panel. 60th Annual Maize Genetics Conference 2018, St. Malo, Frankreich, 22.-25.03.2018, P208

Kamal, N., Fischer, I., Ruban, A., Opitz, N., Seidel, M., Marcon, C., Gundlach, H., Spannagl, M., Houben, A., Presterl, T., Ouzunova, M., Hochholdinger, F., Mayer, K.F.X., Bauer, E., Schön, C.-C., Haberer, G. (2019): European Flint Genomes complementing the Maize Pan- and Coregenome.- Plant and Animal Genome Conference, San Diego, 12.-16.01.2019

6 Vernetzungen

Ein wissenschaftlicher Mitarbeiter des Lehrstuhls für Pflanzenzüchtung absolvierte einen Forschungsaufenthalt in der Arbeitsgruppe von Prof. Natalia de Leon (University of Wisconsin, Madison, USA). Durch die Kooperation wurden wissenschaftliche Erkenntnisse zur Nutzung von Genotypisierungsdaten für die Aufklärung komplexer agronomischer Merkmale ausgetauscht und Methoden gemeinsam weiterentwickelt. Außerdem wurden dort Phänotypisierungsmethoden zur Analyse von Kältetoleranz in Landrassen in kontrollierten Plattformen etabliert.

Die Auswertung der mittels Drohnen erhobenen Luftbilddaten erfolgt in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Scott Chapman (University of Queensland / CSIRO, Australien), um die entsprechenden Datenanalyse-Pipelines in unserer Arbeitsgruppe zu etablieren und die Daten für das Projekt nutzbar zu machen.

Die Kooperation mit Prof. Klaus F. X. Mayer (Helmholtz Zentrum München, HMGU) wurde weiter ausgebaut, um bioinformatische Expertise der beiden Forschungseinrichtungen zu bündeln und diese dem Projektverbund BayKlimaFit zur Verfügung zu stellen. Die zum 01.10.2017 eingestellte wissenschaftliche Mitarbeiterin für Bioinformatik war im Wesentlichen am HMGU tätig, damit die dort vorhandenen umfangreichen Genomressourcen und bioinformatischen Pipelines für die im Projektverbund BayKlimaFit bearbeiteten Kulturpflanzen optimal genutzt und Daten integriert werden konnten. Für Details siehe Bericht des Koordinationsprojektes bzw. weiterer Projektpartner.

Im Rahmen des Projektverbunds BayKlimaFit kooperierten wir mit anderen Arbeitsgruppen, die an der Toleranz gegenüber abiotischen Stressfaktoren forschen, wie z. B. der Arbeitsgruppe von Prof. Erwin Grill (TUM), die Trockenstresstests für Mais etabliert hat, und der Arbeitsgruppe von Prof. Caroline Gutjahr (TUM), die an den Auswirkungen von arbuskulärer Mykorrhiza auf Stresstoleranz in Mais arbeitet.

Die Ergebnisse des Projekts werden mit dem BMBF-geförderten Projektverbund MAZE (<http://www.europeanmaize.net/>) verknüpft, in dem neue theoretische Methoden zur Nutzung genetischer Diversität durch umfangreiche Haplotypenbibliotheken entwickelt werden. Diese Methoden tragen über verbesserte genomweite Leistungsvorhersagemodelle sowie funktionelle Analysen und Berücksichtigung von Gen x Gen Interaktionen zur Aufklärung quantitativ vererbter agronomischer Merkmale bei, um die allelische Variation von Landrassen für die Züchtung verbesserter Sorten zugänglich zu machen.

7 Bestehende und entstandene Industriebeteiligung

Die Entwicklung des Pflanzenmaterials (Gametenfang-Linien) erfolgte in Zusammenarbeit mit der KWS SAAT SE, die sich auch an der Phänotypisierung des Materials beteiligte.

8 Zusammenfassung

Die effiziente züchterische Nutzung der verfügbaren genetischen Vielfalt ist eines unserer wichtigsten Ziele, um die ressourcenschonende Produktion von Lebens- und Futtermitteln sowie nachwachsenden Rohstoffen in Zeiten des Klimawandels zu sichern. Indem vorteilhafte Allele aus Landrassen stärker züchterisch genutzt werden, kann die Anpassung unserer Kulturpflanzen an die sich wandelnden klimatischen Bedingungen gesteigert und gleichzeitig die züchterisch nutzbare Biodiversität erweitert werden. Im Rahmen des Projektes wurde für die Kulturart Mais untersucht, durch welche Strategien die genomische und phänotypische Diversität aus Landrassen für die genetische Verbesserung der Kältetoleranz von Maiszuchtmaterial genutzt werden kann. Zunächst wurde die molekulare Diversität in einem breiten Sortiment europäischer Landrassen durch populationsgenetische Ansätze untersucht. Dabei wurde bestätigt, dass der größte Teil der molekularen Variation jeweils innerhalb von Landrassen zu finden ist. Dies bedeutet, dass bei gezielter Vorauswahl wenige Landrassen ausreichen, um in einer großen Stichprobe innerhalb der Landrassen durch genetische Analysen die allelische Variation zu analysieren. Da es sich bei Mais Landrassen um heterogene und heterozygote Populationen handelt, deren genetische Struktur eine robuste Phänotypisierung und auch die Genotypisierung erschwert, wurde zunächst über einen sogenannten Gametenfang definiertes genetisches Material entwickelt, das anschließend intensiv in vier Feldumwelten (2 Jahre, 2 Orte) für Kältetoleranz, Jugendentwicklung und weitere agronomische Merkmale charakterisiert wurde. In Verbindung mit genomweiten DNA-basierten Daten konnten durch assoziationsgenetische Ansätze Genomregionen identifiziert werden, die Kältetoleranz und Jugendentwicklung in Mais beeinflussen. Es ist geplant, unter Nutzung öffentlich verfügbarer und im Projekt neu erstellter Mais Genomsequenzen und deren Genannotationen genetische Faktoren zu identifizieren, die an der Ausprägung von Kältetoleranz beteiligt sind. Bei ausreichenden Stichprobengrößen ist die genomische Leistungsvorhersage anhand genomweiter DNA-Marker ein geeignetes Werkzeug, um die allelische Variation für Kältetoleranz in Mais Landrassen züchterisch nutzbar zu machen. Bisher nicht genutzte vorteilhafte Allele aus Mais Landrassen können durch innovative genombasierte Züchtungsmethoden in Elitematerial eingelagert werden, um genetische Variation im Zuchtmaterial zu erweitern und damit langfristig den Selektionserfolg und die Entwicklung stresstoleranter, klimaangepasster Sorten zu sichern.

9 Ausblick

Mit den Ergebnissen des Projektes wurde eine hervorragende Grundlage geschaffen, um genetische Vielfalt effizient und zielgerichtet für die Verbesserung der Kältetoleranz in Mais zu nutzen. Für die meisten agronomisch relevanten Merkmale besteht zwischen Mais Landrassen und Elitezuchtmaterial jedoch ein großer Leistungsunterschied. In gewissem Umfang können Inzuchtlinien direkt aus Landrassen entwickelt und auf Leistung selektiert werden. Sollen aber mehrere komplex vererbte Merkmale gleichzeitig züchterisch bearbeitet werden, so ist dies nur durch wiederholte rekurrente Selektion möglich, um so die Frequenz von Genotypen mit erwünschten Allelkombinationen zu erhöhen. Genombasierte Züchtungsmethoden bieten hier neue Möglichkeiten, insbesondere in Kombination mit schnellen Zuchtzyklen. In Bezug auf die Optimierung derartiger neuer Zuchtschemata müssen noch weitere Schritte folgen. Über weiterführende Genomanalysen sollten ausgewählte wichtige Schlüsselgene, die Kältetoleranz und Jugendentwicklung beeinflussen, kloniert und funktional charakterisiert werden, um ihre Rolle in genetischen und regulatorischen Netzwerken zu verstehen und die Nutzung neuer Allele in der Züchtung verbesserter Sorten effizienter zu machen.

Literaturverzeichnis

- [1] Bayerisches Staatsministerium für Umwelt und Verbraucherschutz (2015): Klima-Report Bayern 2015, München.
- [2] Schmidt, W. (2003): Hybridmaiszüchtung bei der KWS SAAT AG. 54. Tagung der Vereinigung der Pflanzenzüchter und Saatgutkaufleute Österreichs, Gumpenstein, Österreich, 25. -27. November 2003, 1-6.
- [3] Dolstra, O., Haalstra, S.R., van der Putten, P.E.L. and Schapendonk, A.H.C.M. (1994): Genetic variation for resistance to low-temperature photoinhibition of photosynthesis in maize (*Zea mays* L.). *Euphytica* 80 (1), 85-93.
- [4] Frascaroli, E. and Landi, P. (2013): Divergent selection in a maize population for germination at low temperature in controlled environment: study of the direct response, of the trait inheritance and of correlated responses in the field. *Theor Appl Genet* 126 (3), 733-46.
- [5] Revilla, P., Rodríguez, V.M., Ordás, A., Rincént, R., Charcosset, A., Giauffret, C., Melchinger, A.E., Schön, C.-C., Bauer, E., Altmann, T., Brunel, D., Moreno-González, J., Campo, L., Ouzunova, M., Laborde, J., Álvarez, Á., Ruíz de Galarreta, J.I. and Malvar, R.A. (2014): Variability for cold tolerance in two large maize inbred panels adapted to European climates. *Crop Sci* 54, 1981-1991.
- [6] Strigens, A., Freitag, N.M., Gilbert, X., Grieder, C., Riedelsheimer, C., Schrag, T.A., Messmer, R. and Melchinger, A.E. (2013): Association mapping for chilling tolerance in elite flint and dent maize inbred lines evaluated in growth chamber and field experiments. *Plant, Cell & Environment* 36 (10), 1871-1887.
- [7] Fracheboud, Y., Ribaut, J.M., Vargas, M., Messmer, R. and Stamp, P. (2002): Identification of quantitative trait loci for cold-tolerance of photosynthesis in maize (*Zea mays* L.). *J Exp Bot* 53 (376), 1967-77.
- [8] Hund, A., Fracheboud, Y., Soldati, A., Frascaroli, E., Salvi, S. and Stamp, P. (2004): QTL controlling root and shoot traits of maize seedlings under cold stress. *Theor Appl Genet* 109 (3), 618-29.
- [9] Presterl, T., Ouzunova, M., Schmidt, W., Moller, E.M., Rober, F.K., Knaak, C., Ernst, K., Westhoff, P. and Geiger, H.H. (2007): Quantitative trait loci for early plant vigour of maize grown in chilly environments. *Theor Appl Genet* 114 (6), 1059-1070.
- [10] Stadlmeier, M. (2015): QTL-Kartierung für Kühltoleranz in *Zea mays* in Dent und Flint DH-Populationen. Masterarbeit, Lehrstuhl für Pflanzenzüchtung, Technische Universität München
- [11] Giraud, H., Lehermeier, C., Bauer, E., Falque, M., Segura, V., Bauland, C., Camisan, C., Campo, L., Meyer, N., Ranc, N., Schipprack, W., Flament, P., Melchinger, A.E., Menz, M., Moreno-González, J., Ouzunova, M., Charcosset, A., Schön, C.-C. and

- Moreau, L. (2014): Linkage disequilibrium with linkage analysis of multi-line crosses reveals different multi-allelic QTL for hybrid performance in the Flint and Dent heterotic groups of maize. *Genetics* 198 (4), 1717-34.
- [12] Greaves, J.A. (1996): Improving suboptimal temperature tolerance in maize - The search for variation. *J Exp Bot* 47 (296), 307-323.
- [13] Sobkowiak, A., Jończyk, M., Jarochovska, E., Biecek, P., Trzcinska-Danielewicz, J., Leipner, J., Fronk, J. and Sowiński, P. (2014): Genome-wide transcriptomic analysis of response to low temperature reveals candidate genes determining divergent cold-sensitivity of maize inbred lines. *Plant Mol Biol* 85 (3), 317-331.
- [14] Kingston-Smith, A.H., Harbinson, J., Williams, J. and Foyer, C.H. (1997): Effect of chilling on carbon assimilation, enzyme activation, and photosynthetic electron transport in the absence of photoinhibition in maize leaves. *Plant Physiol* 114 (3), 1039-1046.
- [15] Leipner, J., Fracheboud, Y. and Stamp, P. (1999): Effect of growing season on the photosynthetic apparatus and leaf antioxidative defenses in two maize genotypes of different chilling tolerance. *Environ Exp Bot* 42 (2), 129-139.
- [16] Nguyen, H.T., Leipner, J., Stamp, P. and Guerra-Peraza, O. (2009): Low temperature stress in maize (*Zea mays* L.) induces genes involved in photosynthesis and signal transduction as studied by suppression subtractive hybridization. *Plant Physiol Biochem* 47 (2), 116-22.
- [17] Kaniuga, Z., Sączyńska, V., Miśkiewicz, E. and Garstka, M. (1999): Degradation of leaf polar lipids during chilling and post-chilling rewarming of *Zea mays* genotypes reflects differences in their response to chilling stress. The role of galactolipase. *Acta Physiol Plant* 21 (1), 45-56.
- [18] Rymen, B., Fiorani, F., Kartal, F., Vandepoele, K., Inzé, D. and Beemster, G.T.S. (2007): Cold nights impair leaf growth and cell cycle progression in maize through transcriptional changes of cell cycle genes. *Plant Physiol* 143 (3), 1429-1438.
- [19] Aroca, R., Tognoni, F., Irigoyen, J.J., Sánchez-Díaz, M. and Pardossi, A. (2001): Different root low temperature response of two maize genotypes differing in chilling sensitivity. *Plant Physiology and Biochemistry* 39 (12), 1067-1073.
- [20] Farooq, M., Aziz, T., Wahid, A., Lee, D.-J. and Siddique, K.H.M. (2009): Chilling tolerance in maize: agronomic and physiological approaches. *Crop Pasture Sci* 60 (6), 501-516.
- [21] McCouch, S., Baute, G.J., Bradeen, J., Bramel, P., Bretting, P.K., Buckler, E., Burke, J.M., Charest, D., Cloutier, S., Cole, G. et al. (2013): Agriculture: Feeding the future. *Nature* 499 (7456), 23-24.
- [22] Takuno, S., Ralph, P., Swarts, K., Elshire, R.J., Glaubitz, J.C., Buckler, E.S., Hufford, M.B. and Ross-Ibarra, J. (2015): Independent molecular basis of convergent highland adaptation in maize. *Genetics* 200 (4), 1297-1312.

- [23] Vigouroux, Y., Glaubitz, J.C., Matsuoka, Y., Goodman, M.M., Sánchez G., J. and Doebley, J. (2008): Population structure and genetic diversity of New World maize races assessed by DNA microsatellites. *Am J Bot* 95 (10), 1240-1253.
- [24] Strigens, A., Schipprack, W., Reif, J.C. and Melchinger, A.E. (2013): Unlocking the genetic diversity of maize landraces with doubled haploids opens new avenues for breeding. *PLOS ONE* 8 (2), e57234-e57234.
- [25] Wilde, K., Burger, H., Prigge, V., Prestler, T., Schmidt, W., Ouzunova, M. and Geiger, H.H. (2010): Testcross performance of doubled-haploid lines developed from European flint maize landraces. *Plant Breeding* 129 (2), 181-185.
- [26] Stadler, L.J. (1944): Gamete selection in corn breeding. *Agron J* 36 (12), 988-989.
- [27] Melchinger, A.E., Schopp, P., Müller, D., Schrag, T.A., Bauer, E., Unterseer, S., Homann, L., Schipprack, W. and Schön, C.-C. (2017): Safeguarding our genetic resources with libraries of doubled-haploid lines. *Genetics* 206 (3), 1611-1619.
- [28] Unterseer, S., Bauer, E., Haberer, G., Seidel, M., Knaak, C., Ouzunova, M., Meitinger, T., Strom, T.M., Fries, R., Pausch, H., Bertani, C., Davassi, A., Mayer, K.F.X. and Schön, C.-C. (2014): A powerful tool for genome analysis in maize: development and evaluation of the high density 600 k SNP genotyping array. *BMC Genomics* 15, 823.
- [29] Gabriel, S.B., Schaffner, S.F., Nguyen, H., Moore, J.M., Roy, J., Blumenstiel, B., Higgins, J., DeFelice, M., Lochner, A., Faggart, M., Liu-Cordero, S.N., Rotimi, C., Adeyemo, A., Cooper, R., Ward, R., Lander, E.S., Daly, M.J. and Altshuler, D. (2002): The structure of haplotype blocks in the human genome. *Science* 296 (5576), 2225-2229.
- [30] Meuwissen, T.H.E., Hayes, B.J. and Goddard, M.E. (2001): Prediction of total genetic value using genome-wide dense marker maps. *Genetics* 157 (4), 1819-1829.
- [31] Albrecht, T., Auinger, H.J., Wimmer, V., Ogutu, J.O., Knaak, C., Ouzunova, M., Piepho, H.P. and Schön, C.-C. (2014): Genome-based prediction of maize hybrid performance across genetic groups, testers, locations, and years. *Theor Appl Genet* 127 (6), 1375-86.
- [32] Albrecht, T., Wimmer, V., Auinger, H.J., Erbe, M., Knaak, C., Ouzunova, M., Simianer, H. and Schön, C.-C. (2011): Genome-based prediction of testcross values in maize. *Theor Appl Genet* 123 (2), 339-350.
- [33] Gorjanc, G., Jenko, J., Hearne, S.J. and Hickey, J.M. (2016): Initiating maize pre-breeding programs using genomic selection to harness polygenic variation from landrace populations. *BMC Genomics* 17 (1), 30.
- [34] Bernardo, R. (2009): Genomewide selection for rapid introgression of exotic germplasm in maize. *Crop Sci* 49 (2), 419-425.

- [35] Karaman, E., Lund, M.S., Anche, M.T., Janss, L. and Su, G. (2018): Genomic prediction using multi-trait weighted GBLUP accounting for heterogeneous variances and covariances across the genome. *G3: Genes|Genomes|Genetics* 8 (11), 3549-3558.
- [36] Spannagl, M., Nussbaumer, T., Bader, K.C., Martis, M.M., Seidel, M., Kugler, K.G., Gundlach, H. and Mayer, K.F.X. (2016): PGSB PlantsDB: updates to the database framework for comparative plant genome research. *Nucleic Acids Res* 44 (D1), D1141-D1147.
- [37] Kurtz, S., Phillippy, A., Delcher, A.L., Smoot, M., Shumway, M., Antonescu, C. and Salzberg, S.L. (2004): Versatile and open software for comparing large genomes. *Genome Biol* 5 (2), R12.
- [38] Mascher, M., Gundlach, H., Himmelbach, A., Beier, S., Twardziok, S.O., Wicker, T., Radchuk, V., Dockter, C., Hedley, P.E., Russell, J. et al. (2017): A chromosome conformation capture ordered sequence of the barley genome. *Nature* 544 (7651), 427-433.
- [39] Schäfer, N., Maierhofer, T., Herrmann, J., Jørgensen, M.E., Lind, C., von Meyer, K., Lautner, S., Fromm, J., Felder, M., Hetherington, A.M., Ache, P., Geiger, D. and Hedrich, R. (2018): A tandem amino acid residue motif in guard cell SLAC1 anion channel of grasses allows for the control of stomatal aperture by nitrate. *Curr Biol* 28 (9), 1370-1379.e5.
- [40] Bayerisches Staatsministerium für Umwelt und Verbraucherschutz, Klima-Report Bayern 2015 - Klimawandel, Auswirkungen, Anpassungs- und Forschungsaktivitäten, StMUV, München, 2015, www.klima.bayern.de.
- [41] Toronto International Data Release Workshop Authors (2009): Prepublication data sharing. *Nature* 461 (7261), 168-170.

Abkürzungsverzeichnis

ABA	Abscisinsäure (<i>abscisic acid</i>)
DH	Doppelhaploide
<i>H</i>	Haplotypenheterozygotie
kb	Kilobasen
KE	Landrasse Kemater Landmais Gelb
LD	Kopplungsphasenungleichgewicht (<i>linkage disequilibrium</i>)
LL	Landrasse Lalin
Mb	Megabasen
MaizeGDB	Maize Genomics Database, www.maizegdb.org
NCBI	National Center for Biotechnology Information, www.ncbi.nlm.nih.gov
PCA	Hauptkomponentenanalyse (<i>principal component analysis</i>)
PCoA	Hauptkoordinatenanalyse (<i>principal coordinate analysis</i>)
PE	Landrasse Petkuser Ferdinand Rot
π	Nukleotiddiversität (<i>π</i>)
QTL	Genomposition eines quantitativ vererbten Merkmals (<i>quantitative trait locus</i>)
S ₁ , S ₂ , S ₃	Erste, zweite, bzw. dritte Selbstungsgeneration aus Individuen der Landrassen
SNP	Einzelnukleotidpolymorphismus (<i>single nucleotide polymorphism</i>)
UAV	Drohne (<i>unmanned aerial vehicle</i>)

Anhang

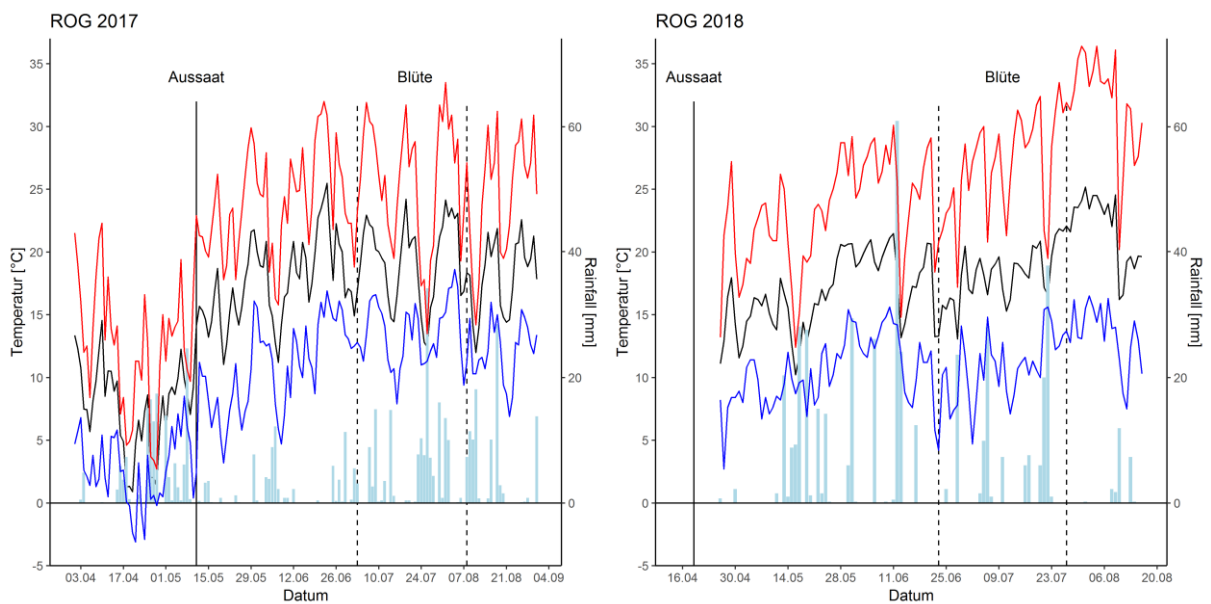


Abbildung A 1: Verlauf der Lufttemperatur 20 cm über dem Boden [°C] und der Niederschläge [mm] (hellblau) am Standort Roggenstein in den Jahren 2017 und 2018. Rot: Maximum, schwarz: Mittelwert, blau: Minimum. Die Aussattermine und der Zeitraum der Blüte sind jeweils gekennzeichnet.

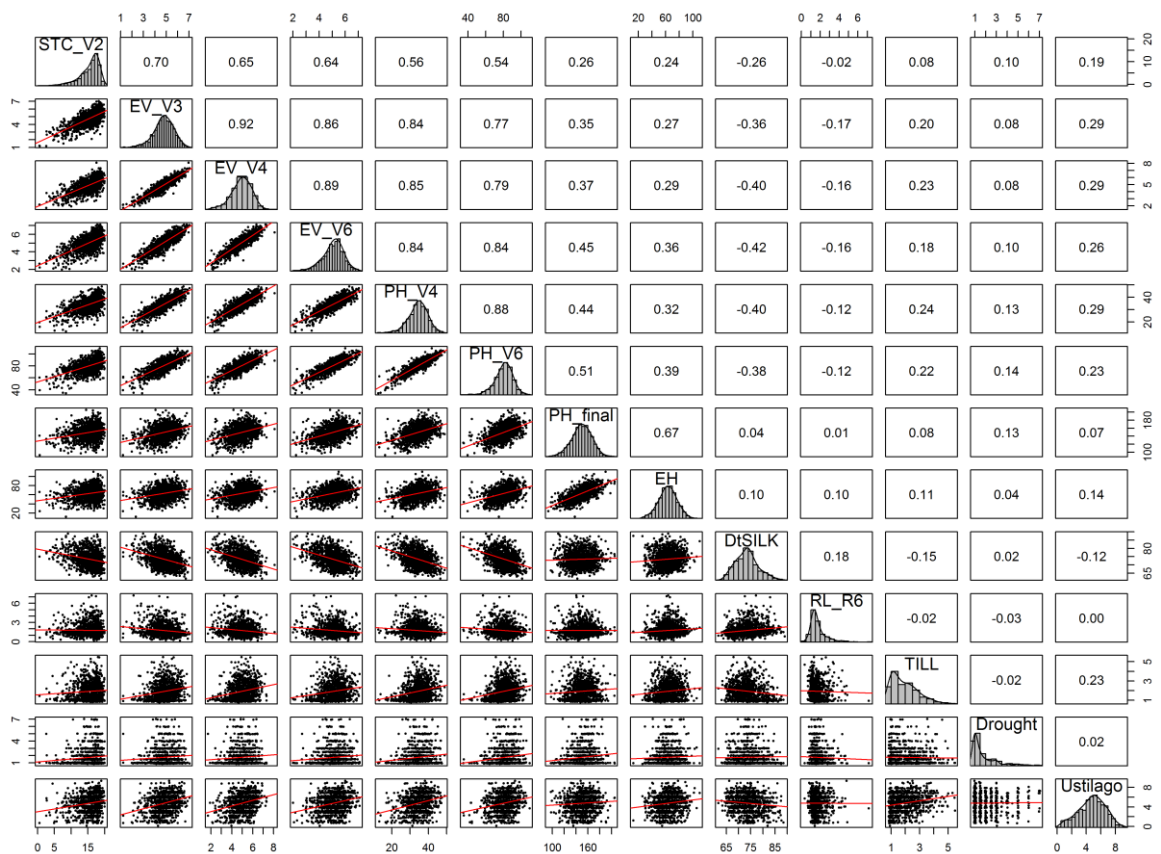


Abbildung A 2: Korrelationen zwischen phänotypischen Merkmalen. Auf der Diagonale ist für jedes Merkmal die Verteilung der adjustierten Mittelwerte über Orte als Histogramm dargestellt. Unterhalb der Diagonale sind die Punktwolken für alle Merkmalspaare und über der Diagonalen die Werte für die jeweilige Korrelation abgebildet. Die Abkürzungen für die einzelnen Merkmale sind in Tabelle 2 aufgelistet.

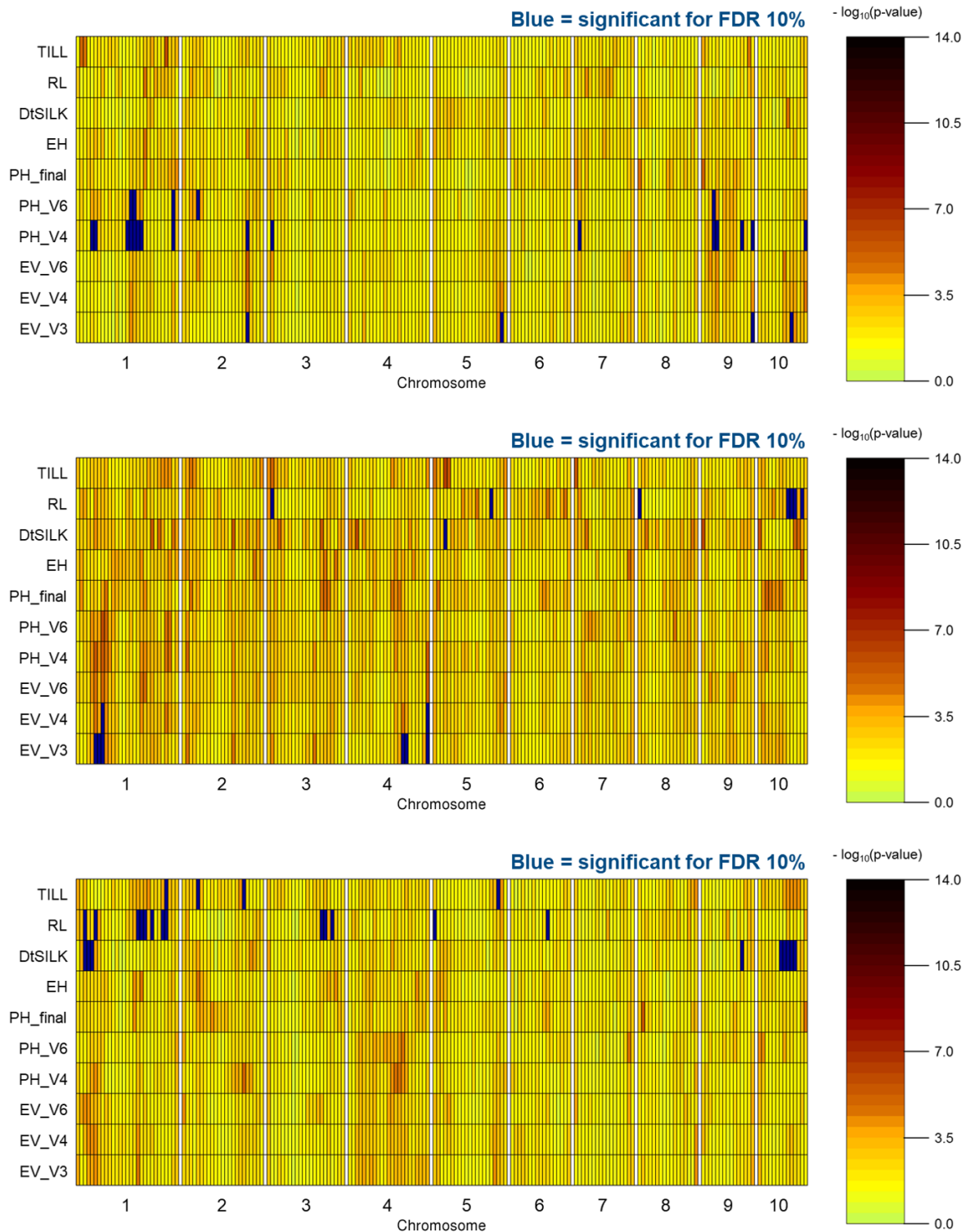


Abbildung A 3: Genomweite Assoziationsstudie für frühe Jugendentwicklung und weitere agronomische Merkmale (siehe Tabelle 1) getrennt für die drei Landrassen (von oben nach unten: KE, LL, PE). Die Darstellung zeigt für 20 Mb Fenster entlang der zehn Mais-Chromosomen den Wert für den negativen dekadischen Logarithmus des p-Werts des signifikantesten Markers je Fenster aus der Assoziationsanalyse. Blau eingefärbte Fenster überschreiten den Grenzwert für eine „false discovery rate“ von 10%.

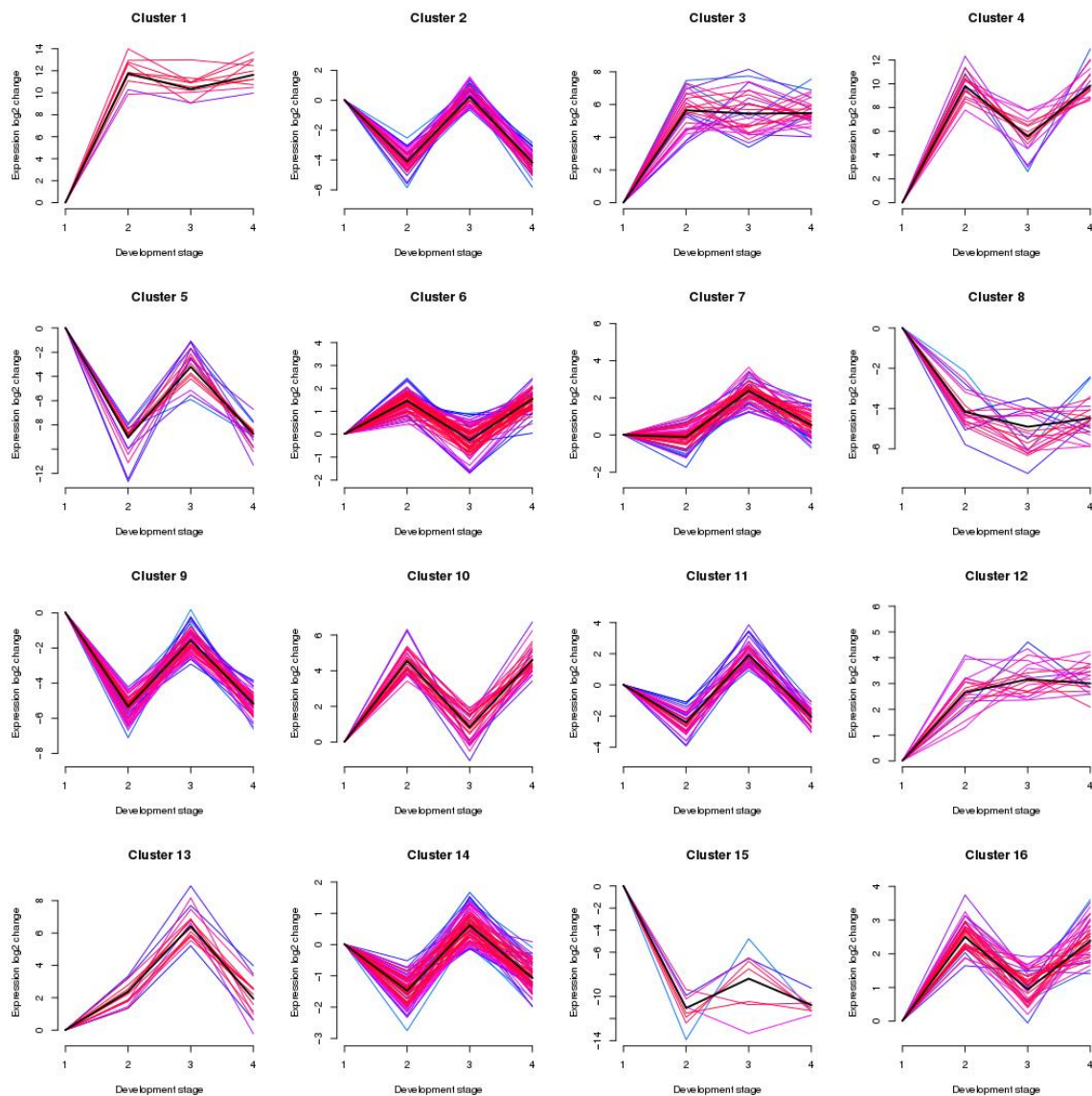


Abbildung A 4: Expressionsclusteranalyse der vier Entwicklungsstadien von Maispollen. Exemplarisch sind Expressionsprofile der ersten 16 Cluster für das Maispollen-Transkriptom gezeigt. Die Entwicklungsstadien 1 - 4 auf der x-Achse entsprechen dem Tetraden-, uni-, bi- und trizellulären Stadium. Änderungen der Genexpression sind auf der y-Achse dargestellt.

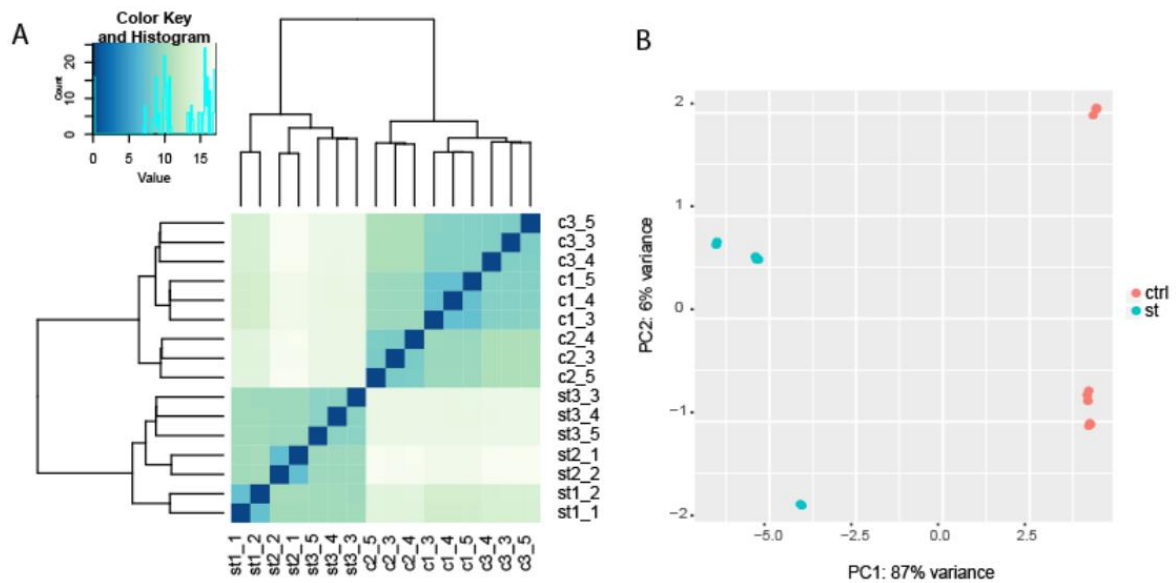


Abbildung A 5: Clusteranalyse und Hauptkomponentenanalyse („*principal component analysis*“, PCA) hitzebehandelter Maispollen. RNAseq-Daten hitzebehandelter (st) und Kontroll- (c) Maispollen zeigen sowohl in der Clusteranalyse (A) als auch in der PCA (B) einen eindeutigen klar separierbaren Effekt der Stressbehandlung auf. Alle Replikate einer Behandlung (Hitze, Kontrolle) weisen dabei ähnliche Charakteristika und eine deutlich niedrigere Varianz gegenüber den Proben der anderen Behandlung auf.