



Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt
Lehrstuhl für Pflanzenzüchtung

Genetische Analyse der stabilen Kohlenstoffisotopendiskriminierung in einer Mais (*Zea mays* L.) Introgressionsbibliothek

Sebastian Gresset

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ. - Prof. Dr. A. Gierl

Prüfer der Dissertation:

1. Univ. - Prof. Dr. C.-C. Schön

2. Univ. - Prof. Dr. P. Westhoff

(Heinrich – Heine – Universität Düsseldorf)

Die Dissertation wurde am 09.07.2014 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 21.10.2014 angenommen.

Teilergebnisse dieser Arbeit wurden vorab veröffentlicht:

Publikation:

Gresset S, Westermeier P, Rademacher S, Ouzunova M, Presterl T, Westhoff P, Schön CC (2014) Stable Carbon Isotope Discrimination Is under Genetic Control in the C₄ Species Maize with Several Genomic Regions Influencing Trait Expression. *Plant Physiol* 164: 131–143

Tagungsbeitrag:

Gresset S, Westermeier P, Höcker N, Presterl T, Ouzunova M, Westhoff P, Schön CC (2013) OPTIMAIS – Züchterische Optimierung der Wassernutzungseffizienz von Energiemais. Deutsche Biotechnologietage 2013, 14.–15. Mai 2013, Stuttgart, Deutschland

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	5
Tabellenverzeichnis	6
Abkürzungsverzeichnis	8
1. Einleitung.....	10
1.1. Mais als Kulturpflanze.....	10
1.2. Indikatoren für die Wassernutzungseffizienz	11
1.2.1. Die Diskriminierung von stabilen Kohlenstoffisotopen	12
1.2.2. Diskriminierung stabiler Kohlenstoffisotope in C ₃ -Pflanzen	14
1.2.3. Diskriminierung stabiler Kohlenstoffisotope in C ₄ -Pflanzen	16
1.3. Introgressionsbibliotheken.....	19
1.3.1. Entwicklung von Introgressionsbibliotheken	20
1.3.2. Detektion von QTL basierend auf Introgressionsbibliotheken.....	20
1.3.3. Introgressionsbibliotheken in der Analyse der genetischen Grundlagen von Epistasie und Heterosis.....	21
1.3.4. Introgressionsbibliotheken in der praktischen Anwendung.....	23
1.4. Ziele der vorliegenden Arbeit.....	25
2. Material und Methoden	26
2.1. Material.....	26
2.1.1. Entwicklung der Introgressionsbibliothek.....	26
2.2. Methoden.....	29
2.2.1. Genotypisierung der Introgressionsbibliothek.....	29
2.2.2. Phänotypisierung der Introgressionsbibliothek	31
2.2.3. Simulationsstudie und Identifikation von Genomregionen mit Einfluss auf die phänotypische Ausprägung	40
3. Ergebnisse.....	47
3.1. Genotypisierung der Introgressionsbibliothek mit SSR Markern.....	47
3.2. Genotypisierung der Introgressionsbibliothek mit SNP Markern.....	49
3.2.1. SNP Verteilung und Qualitätskontrolle im genetischen Material der Introgressionsbibliothek.....	49
3.2.2. Genetische Charakterisierung der Introgressionsbibliothek mit 1.861 SNP.....	55
3.2.3. Verteilung der Donorgenom-Zielregionen.....	60
3.3. Vergleich statistischer Verfahren für die Detektion von signifikanten Phänotyp- Genotyp Assoziationen.....	62
3.4. Ausprägung des Merkmals $\Delta^{13}\text{C}$ in der Introgressionsbibliothek unter optimaler Wasserverfügbarkeit.....	66
3.4.1. Genotypische Variation von $\Delta^{13}\text{C}$ in der Introgressionsbibliothek.....	66
3.4.2. Genotypische Variation in Merkmalen der Pflanzenentwicklung und Pflanzenphysiologie.....	69

3.4.3. Introgressionslinien mit signifikantem Effekt in $\Delta^{13}\text{C}$	70
3.4.4. Korrelation von $\Delta^{13}\text{C}$ mit Merkmalen der Pflanzenentwicklung und der Pflanzenphysiologie.....	73
3.4.5. Lokalisation von Donorgenomregionen mit Einfluss auf $\Delta^{13}\text{C}$ und Merkmalen der Pflanzenentwicklung und der Pflanzenphysiologie.....	76
3.5. Ausprägung des Merkmals $\Delta^{13}\text{C}$ in der Introgressionsbibliothek unter kontrastierender Wasserverfügbarkeit.....	82
3.5.1. Genotypische Variation von $\Delta^{13}\text{C}$ und von Merkmalen der Pflanzenentwicklung und Pflanzenphysiologie unter kontrastierender Wasserverfügbarkeit.....	82
3.5.2. Korrelationen von $\Delta^{13}\text{C}$ mit Merkmalen der Pflanzenentwicklung und Pflanzenphysiologie unter kontrastierender Wasserverfügbarkeit.....	87
3.5.3. Introgressionslinien mit signifikantem Effekt in $\Delta^{13}\text{C}$ unter kontrastierender Wasserverfügbarkeit.....	90
4. Diskussion	95
4.1. Variation des Merkmals $\Delta^{13}\text{C}$ in der C_4 Spezies Mais.....	95
4.1.1. Die Ausprägung von $\Delta^{13}\text{C}$ in der Mais Introgressionsbibliothek wird genetisch determiniert.....	96
4.1.2. Genotypische Variation von $\Delta^{13}\text{C}$ unter optimaler Wasserverfügbarkeit.....	96
4.1.3. Genotypische Variation von $\Delta^{13}\text{C}$ unter reduzierter Wasserverfügbarkeit	97
4.1.4. Die Variation von $\Delta^{13}\text{C}$ in Blättern und Körnern	101
4.1.5. Genomregionen, die mit $\Delta^{13}\text{C}$ in der Mais Introgressionsbibliothek assoziiert sind.....	103
4.1.6. Assoziation der $\Delta^{13}\text{C}$ Ausprägung mit Merkmalen der Pflanzenentwicklung und Pflanzenphysiologie.....	107
4.2. Genotypische Struktur der Introgressionsbibliothek	112
4.2.1. Eignung und Verlässlichkeit des MaizeSNP50 BeadChip	112
4.2.2. Genotypische Struktur der Introgressionsbibliothek mit SSR und SNP Markern	116
4.2.3. Statistische Verfahren für die Detektion von Genomregionen mit Einfluss auf die phänotypische Merkmalsausprägung	118
5. Ausblick	123
6. Zusammenfassung	128
Literaturverzeichnis.....	130
Anhang	146

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Theoretische Zusammenhang zwischen $\Delta^{13}\text{C}$ und dem Verhältnis zwischen der CO_2 Konzentration im substomatären Raum und der CO_2 Konzentration in der Atmosphäre in Abhängigkeit von der <i>leakiness</i>	18
Abbildung 2 A Phänotypischer Vergleich der Eltern der Introgressionsbibliothek und B Prüfung der 89 IL Linien und IL-RE im Feldversuch 2011.	27
Abbildung 3 Schematische Darstellung der IL Entwicklung..	28
Abbildung 4 Entwicklung des Bodenwassergehaltes in Relation zur nutzbaren Feldkapazität im Gewächshausversuch 2012.	35
Abbildung 5 A Schematische Darstellung der Identifikation von Zielregionen und B Erstellung der Design Matrix W der Zielregionen	41
Abbildung 6 Verteilung von 32.194 SNP des MaizeSNP50 BeadChip über die 10 Mais Chromosomen	54
Abbildung 7 Verteilung der für die Charakterisierung der IL verwendeten 1.861 SNP über die 10 Mais Chromosomen.	57
Abbildung 8 Überblick über die genetische Struktur der 89 IL Linien.	59
Abbildung 9 Paarweises Kopplungsphasenungleichgewicht zwischen 177 Zielregionen basierend auf 89 IL Linien	61
Abbildung 10 Sensitivität und Spezifität der statistischen Verfahren bezüglich der korrekten Lokalisation von simulierten QTL.	63
Abbildung 11 Leistung der getesteten statistischen Verfahren in der Lokalisation der drei QTL mit größtem Effekt.....	64
Abbildung 12 A Übersicht über die Genotypen von 77 IL Linien basierend auf 1.861 SNP Markern und B Die jeweilige Linienleistung für $\Delta^{13}\text{C}$ im Feld und im Gewächshaus 2011, sowie über diese beiden Experimente für $\Delta^{13}\text{C}$ und weibliche Blüte	72
Abbildung 13 Korrelation zwischen dem Chlorophyllgehalt des Kolbenblattes und $\Delta^{13}\text{C}$	75
Abbildung 14 Physikalische Position der Zielregionen, die $\Delta^{13}\text{C}$ beeinflussen.	78
Abbildung 15 Zusammenhang zwischen dem absoluten Effekt einer Zielregion auf $\Delta^{13}\text{C}$ und A der physikalischen Länge der Zielregionen und B der Anzahl an annotierten Genen für die jeweilige Zielregion	79
Abbildung 16 Statistischer linearer Zusammenhang zwischen $\Delta^{13}\text{C}$ und der Anzahl Körner je Pflanze unter optimaler und suboptimaler Wasserverfügbarkeit im Gewächshaus 2012	89
Abbildung 17 Phänotypische $\Delta^{13}\text{C}$ -Werte der selektierten IL Linien im Vergleich zum rekurrenten Elter	91
Abbildung 18 Auswahl an bereits vollständig homozygoten subIL Linien mit zusätzlichen Rekombinationsereignissen innerhalb der jeweiligen Donorgenomfragmente der IL Linien IL-80 und IL-81 für die Verifikation und Feinkartierung der $\Delta^{13}\text{C}$ Genomregionen.	127

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Markerselektion ausgehend von 56.110 SNP Markern des Illumina MaizeSNP50 BeadChip	30
Tabelle 2 Übersicht über die Feld-, Gewächshaus- und Klimakammerversuche.....	32
Tabelle 3 Übersicht über die Genotypisierung der IL mit 226 SSR Markern.....	47
Tabelle 4 Qualität und Verlässlichkeit von 32.194 SNP Marker des MaizeSNP50 BeadChip	52
Tabelle 5 Anzahl SNP, physikalische Länge, Donorgenomabdeckung und durchschnittlicher, kleinster und größter Abstand zweier benachbarter SNP.....	56
Tabelle 6 Phänotypischer Mittelwert des rekurrenten Elters und Mittelwert, Minimum, Maximum der IL Linien von acht Merkmalen erfasst im Feld- und von acht Merkmalen erfasst in Gewächshaus 2011 sowie ein Merkmal erfasst in einem Klimakammerversuch.....	67
Tabelle 7 Schätzwerte der genotypischen, Genotyp-Umwelt Interaktion und Fehler-Varianzkomponenten sowie Heritabilitäten für sieben Merkmale erfasst in Feld und Gewächshaus 2011.	68
Tabelle 8 Schätzwerte aus den Einzelumwelten für genotypische und Fehler Varianzkomponenten sowie Schätzwerte für die Wiederholbarkeit für acht im Feld und acht im Gewächshaus 2011 erfasste Merkmale sowie ein in Klimakammern erfasstes Merkmal.	69
Tabelle 9 Phänotypische und genotypische Korrelationskoeffizienten zwischen sieben Merkmalen basierend auf 77 IL Linien getestet in Feld-, Gewächshaus 2011- und Klimakammerversuchen.....	73
Tabelle 10 Phänotypische Korrelationskoeffizienten innerhalb des Feld- und Gewächshaus 2011- Versuches zwischen sieben Merkmalen basierend auf den Mittelwerten von 77 IL Linien getestet im Feld und Gewächshaus 2011.	74
Tabelle 11. Mit $\Delta^{13}\text{C}$ assoziierte Zielregionen basierend auf 77 IL Linien evaluiert im Feld und Gewächshaus 2011.	77
Tabelle 12 Phänotypischer Mittelwert des Donor-Elters, des rekurrenten Elters und Mittelwert, Minimum, Maximum von 33 selektierten IL Linien für zehn Merkmale erfasst in Gewächshaus 2012 unter optimaler und suboptimaler Wasserversorgung.	83
Tabelle 13 Schätzwerte der genotypischen und Fehler Varianzkomponenten und Wiederholbarkeiten für zehn in Gewächshaus 2012 unter optimaler und suboptimaler Wasserverfügbarkeit erfasste Merkmale.	85
Tabelle 14 Schätzwerte der genotypischen, Genotyp-Behandlung Interaktion und Fehler-Varianzkomponenten und Heritabilitäten für zehn in beiden Behandlungen von Gewächshaus 2012 erfasste Merkmale.	86
Tabelle 15 Phänotypische Korrelationskoeffizienten zwischen neun phänotypischen Merkmalen mit signifikanter genotypischer Variation unter optimaler und suboptimaler Wasserverfügbarkeit, basierend auf 33 IL Linien getestet im Gewächshaus 2012.	88

Tabelle 16 Prozent der phänotypischen Varianz für Anzahl Körner je Pflanze, erklärt durch die Kombination von $\Delta^{13}\text{C}$ und ASI in der optimal und suboptimal bewässerten Behandlung des Gewächshaus 2012.	90
Tabelle 17 Mit $\Delta^{13}\text{C}$ assoziierte Zielregionen basierend auf 33 unter optimaler Wasserverfügbarkeit im Gewächshaus 2012 getesteten IL Linien.....	93

Abkürzungsverzeichnis

ADD	additiver Effekt einer Zielregion
AK	Anzahl Körner je Pflanze
ASI	Anthesis-Silking Intervall
BC	Rückkreuzungsgeneration (backcross)
BLM	Blüte männlich
bp	Basenpaare
BR	Blattrollen
BT	Blatttemperatur
BLW	Blüte weiblich
CAM	Crassulacean Acid Metabolism
Chr	Chromosom
$C_i C_a^{-1}$	Verhältnis zwischen der CO ₂ Konzentration im substomatären Raum und der CO ₂ Konzentration in der Atmosphäre
CIMMYT	International Maize and Wheat Improvement Center (Centro Internacional de Mejoramiento de Maiz y Trigo)
cM	centiMorgan
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
DH	Doppelt Haploide
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EC	Entwicklungsstadium
FDR	falsch Positiven Rate (false discovery rate)
Feld	Feldversuch 2011
FN	falsch Negative
FP	falsch Positive
$F_v F_M^{-1}$	effektive Quantenausbeute des Photosystem II
F ₂	2. Filialgeneration
Gb	Gigabasenpaare
GV	Keimlingstriebkraft (germination vigor)
GWH11	Gewächshausversuch 2011
GWH12	Gewächshausversuch 2012
GWH12_opt	optimal bewässerte Behandlung des Gewächshausversuchs 2012
GWH12_sub	suboptimal bewässerte Behandlung des Gewächshausversuchs 2012
ha	Hektar
ID _{33IL}	Identifikationsnummer der Zielregion basierend auf 33 IL Linien
ID _{77IL}	Identifikationsnummer der Zielregion basierend auf 77 IL Linien
ID _{89IL}	Identifikationsnummer der Zielregion basierend auf 89 IL Linien
IL	Introgressionsbibliothek (introgression library)
IL-DE	Donor-Elter der Introgressionsbibliothek
IL-RE	rekurrenter Elter der Introgressionsbibliothek
ISTA	Internationale Vereinigung für Saatgutprüfung (International Seed Testing Association)
LASSO	least absolute shrinkage and selection operator
LD	Kopplungsphasenungleichgewicht (linkage disequilibrium)
LSD	kleinste gesicherte Differenz (least significant difference)
MAS	markergestützte Selektion (marker-assisted selection)

Mb	Megabasenpaare
NIL	nah-isogene Linie
nFK	nutzbare Feldkapazität
Nr	Anzahl
ns	nicht signifikant
PEPC	Phospho <i>eno</i> lpyruvatcarboxylase
QTL	Quantitative Trait Locus
QTL ^M	drei größte simulierte Effekte
RCB	vollständig randomisiertes Blockanlage (randomized complete block)
REML	restricted maximum likelihood estimation
Rep	Wiederholbarkeit (repeatability)
RFLP	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus
RIL	rekombinante Inzuchtlinien
RuBisCO	Ribulose-1,5-bisphosphat-carboxylase/-oxygenase
SD	Standardabweichung (standard deviation)
s.e.	Standardfehler (standard error)
SenL	Anteil seneszenten Blätter (senescent leaves)
SMR	Einzelmarkerregression (single marker regression)
SMR_BK	Einzelmarkerregression mit Bonferroni Korrektur
S _n	Sensitivität
SNP	Einzelnukleotid-Polymorphismus (single nucleotide polymorphism)
S _p	Spezifität
SPAD	Chlorophyllgehalt des Kolbenblattes
SR_AIC	schrittweise Regression mit Akaike Informationskriterium
SR_BIC	schrittweise Regression mit Bayes'schem Informationskriterium
SSR	Mikrosatelliten (simple sequence repeat)
TN	richtig Negative (true negatives)
TP	richtig Positive (true positives)
TRR_BLUP	threshold ridge regression best linear unbiased estimator
VPDB	Vienna Pee Dee Belemnite
WH	Wuchshöhe
WUE	Wassernutzungseffizienz (water use efficiency)
δ _l	durchschnittliches δ ¹³ C der Atmosphäre
Δ ¹³ C _B	Kohlenstoffisotopendiskriminierung gemessen in den Blättern
Δ ¹³ C _K	Kohlenstoffisotopendiskriminierung gemessen in den Körnern
φ	leakiness

1. Einleitung

1.1. Mais als Kulturpflanze

Mais (*Zea mays* L. ssp. *mays*) ist eine einjährige Kulturpflanze aus der Familie der Süßgräser (*Poaceae*), die ursprünglich aus dem subtropischen Raum in Süd- und Mittelamerika stammt. Die Kulturform Mais entstammt dem Wildgras Teosinte (*Zea mays* L. ssp. *parviglumis*) (Beadle, 1939), weist einen diploiden Chromosomensatz ($2n = 20$) auf und ist monözisch, diklin (Neuffer & Coe, 1974, Miedaner, 2010). In Abhängigkeit von Form und Struktur der Körner lässt sich Mais systematisch in sieben Varietäten einordnen. Von diesen hat Zahnmais (Dent) mit ca. 73 % der weltweiten Anbaufläche die wirtschaftlich größte Bedeutung, gefolgt vom Hartmais (Flint) mit einem Anteil von 14 % (Mejia, 2003). Weltweit stellt Körnermais mit einer Anbaufläche von knapp 177 Mio. ha und einer Gesamtproduktion von 872 Mio t im Jahr 2012 vor Reis und Weizen die wichtigste Getreideart dar (Martin et al., 2006, FAO Statistics Division, 2014). In vielen Regionen Lateinamerikas, Afrikas, Indiens und Chinas dient Mais als Grundlage für die menschliche Ernährung. In Deutschland wurden 2012 insgesamt 2,6 Mio. ha Mais angebaut, überwiegend Hybriden aus Zahnmais und Hartmais und dabei ein Körnermaisertrag von 5 Mio t und ein Silomaisertrag von 95 Mio. t erwirtschaftet (Deutsches Maiskomitee e.V.). Der Großteil der Maisernte wird als Futtermittel, zur Energiegewinnung oder als Rohstoff in Industriezweigen, wie Lebensmittel-, Getränke-, Verpackungs-, Textil- und Pharmaindustrie eingesetzt (Mejia, 2003). Aufgrund der immensen Bedeutung von Mais für die Nahrungsmittel- und Energieproduktion ist eine weltweit stetige Ausweitung des Maisanbaus wahrscheinlich (Edgerton, 2009).

Im Rahmen des Klimawandels wird von einem globalen Anstieg der bodennahen Durchschnittstemperaturen um 2,4 °C bis 3,4 °C ausgegangen (Solomon et al., 2007). Als direkte Konsequenz wird es in vielen Regionen der Welt, so auch in Europa, zu einer zeitlichen Verschiebung der Niederschlagsverteilung kommen. Für Europa wird ein Niederschlagsrückgang von 20 % bis 50 % in der Vegetationszeit und eine Niederschlagszunahme um 10 % bis 20 % in den Wintermonaten prognostiziert (Christensen et al., 2011). Dies wird auch erhebliche Auswirkungen auf den Maisanbau haben. Bereits seit 1961 wird die künstlich beregnete

landwirtschaftliche Fläche in Europa im Durchschnitt um jährlich 144.000 ha erweitert (Strosser et al., 1999) und ein großer Teil davon entfällt auf die Maisproduktion. Insbesondere in Griechenland, Italien, Portugal und Spanien beträgt bereits jetzt der Anteil der künstlich bewässerten Maisfläche an der gesamten Maisfläche zwischen 60 % und 100 %. In Frankreich stehen derzeit bereits ca. 45 % der Maisanbauflächen unter künstlicher Bewässerung (Eurostat, 2007). Dabei lassen der sorglose Umgang mit den Wasservorräten und der steigende Wasserverbrauch, der mit der wachsenden Weltbevölkerung einhergeht, Wasser in vielen Regionen der Erde und dabei auch in Europa immer knapper werden (Schröter et al., 2005). Eine deutlich effizientere Wassernutzung ist daher erforderlich, um zukünftige Erträge zu sichern (Molden, 2007). Dies kann über effizientere Techniken der Bewässerung und Methoden im Pflanzenbau, aber vor allem durch die pflanzenzüchterische Entwicklung von Sorten mit höherer Wassernutzungseffizienz (WUE, „water-use efficiency“) erfolgen (Boyer, 1996, Wallace, 2000). Die Entwicklung von Sorten mit hoher WUE setzt die Identifikation und Selektion von Genotypen mit hoher WUE voraus. Hierfür sind phänotypische Merkmale notwendig, die eine sichere Beurteilung der WUE vieler Genotypen mit möglichst geringem Aufwand ermöglichen.

1.2. Indikatoren für die Wassernutzungseffizienz

Im Allgemeinen wird WUE als das Verhältnis zwischen der Menge an assimiliertem Kohlenstoff und der dabei aufgewandten Menge an Wasser definiert (Bacon, 2004). Eine Steigerung der WUE kann somit prinzipiell sowohl durch eine verstärkte Kohlenstoffassimilierung als auch durch eine Reduktion der dabei aufzuwendenden Wassermenge erreicht werden. In der Praxis bestehen diverse Definitionen für WUE, je nachdem wie die Menge an assimiliertem Kohlenstoff und die Menge an aufgewandtem Wasser erfasst werden. Die sogenannte „effektive“ WUE (WUE_e) wird meist mittels Gaswechsellmessung an einzelnen Blättern oder Blattteilen als Konzentrationsänderungen von CO_2 und H_2O in einem offenen oder geschlossenen System gemessen (Polley, 2002). Im Gegensatz dazu ist die „intrinsische“ WUE (WUE_i) das Verhältnis zwischen der assimilierten Kohlenstoffmenge und der stomatären Leitfähigkeit und somit weniger abhängig vom atmosphärischen Wasserdampfgehalt als WUE_e (Morgan & LeCain, 1991, Johnson, 1993, Gilbert et

al., 2011a). Das Verhältnis der produzierten Biomasse zur dabei genutzten Wassermenge wird als „Langzeit“ WUE (WUE_B) bezeichnet (Martin & Thorstenson, 1988) und meist in Topfexperimenten, wie u.a. in Farquhar & Richards (1984) beschrieben, gemessen. Der Vorteil von WUE_B gegenüber WUE_e oder WUE_i ist, dass WUE_B deutlich unempfindlicher gegenüber kurzfristigen Änderungen in den Umweltbedingungen ist, da die Messung über einen längeren Zeitraum und nicht nur über wenige Minuten, wie bei WUE_e oder WUE_i , erfolgt (Martin & Thorstenson, 1988). Als eine Variante von WUE_B kann der Wasserverbrauch über einen bestimmten Zeitraum auf den Kornertrag und nicht auf die gesamte produzierte Biomasse bezogen werden. Diese Maßzahl wird als die „ertragsbezogene“ WUE (WUE_Y) bezeichnet (Xue et al., 2006).

Sowohl WUE_i wie auch WUE_e werden nur über einen sehr kurzen Zeitraum (wenige Minuten) und nur an einzelnen Pflanzenteilen (einzelne Blätter) erfasst. Die Extrapolation auf die „Langzeit“ WUE eines bestimmten Genotyps ergibt somit eine wenig tragfähige Datenlage für die abschließende Beurteilung eines Genotypen (Martin & Thorstenson, 1988). WUE_B und WUE_Y sind aufgrund der Integration der WUE über einen längeren Zeitraum deutlich geeigneter, um die WUE eines Genotyps zu bestimmen. Die Messungen von WUE_B und WUE_Y sind jedoch zeitlich und arbeitstechnisch extrem aufwendig und werden meist unter kontrollierten Bedingungen (z.B. im Gewächshaus) durchgeführt, was einerseits den Durchsatz auf wenige Genotypen beschränkt, andererseits nicht unbedingt die WUE der Genotypen im Feld erfasst (Martin & Thorstenson, 1988). Daher werden für eine Phänotypisierung im Hochdurchsatz Methoden benötigt, die mit vergleichsweise geringem Aufwand die WUE integrierend über die gesamte Vegetationsperiode erfassen. In der wissenschaftlichen Literatur wird dazu u.a. die Diskriminierung der stabilen Kohlenstoffisotope ^{13}C und ^{12}C während der photosynthetischen Kohlenstoffassimilierung in Pflanzen mit C_3 -Typ-Photosynthese beschrieben (Condon et al., 2004).

1.2.1. Die Diskriminierung von stabilen Kohlenstoffisotopen

Unter natürlichen Bedingungen liegen die beiden stabilen Isotope des Kohlenstoffs in der Atmosphäre in einem Verhältnis von 1,1 % (^{13}C) zu 98,9 % (^{12}C) vor (Farquhar et

al., 1989). Aufgrund der geringen Häufigkeit von ^{13}C wird das Verhältnis von $^{13}\text{C} \text{ }^{12}\text{C}^{-1}$ in einer Probe als die relative Differenz ($\delta^{13}\text{C}$) des $^{13}\text{C} \text{ }^{12}\text{C}^{-1}$ Verhältnisses der Probe zu dem $^{13}\text{C} \text{ }^{12}\text{C}^{-1}$ Verhältnis eines Referenzmaterials ausgedrückt (Hayes, 1983) und durch

$$\delta^{13}\text{C} = \left(\frac{R_{\text{Probe}}}{R_{\text{Referenz}}} - 1 \right) \times 10^3$$

ermittelt. Dabei bezeichnet R_{Probe} das $^{13}\text{C} \text{ }^{12}\text{C}^{-1}$ Verhältnis der Probe und R_{Referenz} das $^{13}\text{C} \text{ }^{12}\text{C}^{-1}$ Verhältnis des Referenzmaterials (Farquhar et al., 1989). Als R_{Referenz} wird meist das Isotopenverhältnis von Pee Dee Belemnite (PDB) verwendet, eine Kalziumkarbonatablagerung eines marinen Fossils der Kreidezeit, welches in der PeeDee Formation in South Carolina (USA) gefunden wurde und einen außergewöhnlich hohen ^{13}C -Gehalt aufweist ($^{13}\text{C} \text{ }^{12}\text{C}^{-1} = 0,112372$) (Schmid et al., 1978), weshalb alle natürlich auftretenden ^{13}C -Verhältnisse i.d.R. ein negatives Vorzeichen tragen. Da PDB nur sehr begrenzt zur Verfügung steht, gibt es einen offiziellen auf PDB kalibrierten sekundären Standard, Vienna Pee Dee Belemnite (VPDB) (Craig, 1957, Gronig, 2004).

Der molare Anteil von ^{13}C in der Atmosphäre beträgt im Durchschnitt 0,01115, weshalb das $\delta^{13}\text{C}$ der Atmosphäre negativ ist und ca. -8 ‰ beträgt (Farquhar & Richards, 1984). In Pflanzen ist das Verhältnis von ^{13}C zu ^{12}C geringer als in der Atmosphäre (Wickman, 1952). Dies erklärt sich durch die Diskriminierung gegen $^{13}\text{CO}_2$ während der photosynthetischen CO_2 -Fixierung. Diese Diskriminierung ($\Delta^{13}\text{C}$) wird meist in Relation zum Ausgangsstoff (atmosphärisches CO_2) ausgedrückt und ist definiert durch:

$$\Delta^{13}\text{C} = \frac{\delta^{13}\text{C}_{\text{Luft}} - \delta^{13}\text{C}_{\text{Pflanze}}}{1 + \frac{\delta^{13}\text{C}_{\text{Pflanze}}}{10^3}}$$

Dabei steht $\delta^{13}\text{C}_{\text{Pflanze}}$ für das $\delta^{13}\text{C}$ der Pflanze und $\delta^{13}\text{C}_{\text{Luft}}$ für das $\delta^{13}\text{C}$ des CO_2 in der Luft (-8‰) (Farquhar et al., 1989, Lambers et al., 2008). Eine geringere Diskriminierung, also kleinere $\Delta^{13}\text{C}$ Werte, deuten daher auf einen größeren Anteil an ^{13}C Atomen im pflanzlichem Gewebe.

Obwohl alle Pflanzen ein negatives $\delta^{13}\text{C}_{\text{Pflanze}}$ aufweisen (O'Leary, 1981), zeigte sich bereits kurz nach der Entdeckung der C_4 -Typ-Photosynthese (Kortschak et al., 1965, Hatch & Slack, 1966, Hatch & Slack, 1970), dass C_4 -Pflanzen aufgrund des

komplexeren CO₂-Fixierungsmechanismus ein deutlich höheres $\delta^{13}\text{C}_{\text{Pflanze}}$ aufweisen als Pflanzen mit C₃-Typ-Photosynthese (Bender, 1968, Smith & Epstein, 1971). Somit bestehen grundlegende Unterschiede in der stabilen Kohlenstoffisotopendiskriminierung zwischen diesen beiden Photosynthese Typen. Auf diese Unterschiede soll im Folgenden eingegangen werden.

1.2.2. Diskriminierung stabiler Kohlenstoffisotope in C₃-Pflanzen

Alle höheren Pflanzen können jeweils einem von drei Typen der photosynthetischen Kohlenstoffassimilierung zugeordnet werden, dem C₃-, C₄- oder CAM- (*Crassulacean Acid Metabolism*) Typ (Ehleringer & Monson, 1993). Der dabei evolutionär älteste und am meisten verbreitete Mechanismus der photosynthetischen Kohlenstoffassimilierung ist die C₃-Photosynthese bzw. der Calvin-Benson Zyklus (Sage et al., 2012). In Pflanzen, die die C₃-Photosynthese betreiben, hängt die Kohlenstofffixierung ausschließlich vom Enzym Ribulose-1,5-bisphosphat-carboxylase/-oxygenase (RuBisCO) ab. Aufgrund von kinetischen Eigenschaften und thermodynamischen Effekten diskriminiert die RuBisCO gegen ¹³CO₂ (Farquhar et al., 1989, O’Leary, 1993), wobei das Ausmaß der Diskriminierung vom Verhältnis zwischen der CO₂ Konzentration im substomatären Raum der Blätter (*c_i*) und der CO₂ Konzentration in der die Pflanze umgebenden Atmosphäre (*c_a*) abhängt (Condon et al., 2006). Die Abhängigkeit zwischen $\Delta^{13}\text{C}$ und den zu Grunde liegenden physiologischen bzw. biochemischen Prozessen in C₃-Pflanzen kann durch

$$\Delta^{13}\text{C} = a + (b - a) \times \frac{c_i}{c_a}$$

modelliert und vorhergesagt werden. Der Faktor *b* beschreibt die Diskriminierung gegen ¹³CO₂ durch die RuBisCO und der Faktor *a* bezeichnet die Diskriminierung gegen ¹³CO₂ an den Stomata wo es bedingt durch die etwas größere Masse von ¹³C gegenüber ¹²C zu einer langsameren Diffusion und somit einer Diskriminierung gegen ¹³CO₂ kommt (Farquhar & Richards, 1984, Farquhar et al., 1989, Condon et al., 2006). Beide Faktoren, *a* und *b*, wurden in einem diversen Set an C₃-Pflanzen ermittelt und auf *a* = 4,4 ‰ und *b* = 28,0 ‰ standardisiert (Farquhar et al., 1982). Unter Berücksichtigung dieser beiden Konstanten besteht somit ein linearer Zusammenhang zwischen *c_i c_a⁻¹* und $\Delta^{13}\text{C}$. Da *c_i c_a⁻¹* im direkten Zusammenhang mit

der Transpiration und somit der WUE_i steht, besteht in C_3 -Pflanzen ebenfalls ein linearer Zusammenhang zwischen WUE_i und $\Delta^{13}C$. Dieser Zusammenhang wurde bisher u.a. in Baumwolle (*Gossypium herbaceum* L.) (Saranga et al., 1999), Erdnuss (*Arachis hypogea* L.) (Wright et al., 1988, Rowland & Lamb, 2005), Gerste (*Hordeum vulgare* L.) (Hubick & Farquhar, 1989, Robinson et al., 2000), Kartoffel (*Solanum tuberosum* L.) (Vos & Groenwold, 1989), Raps (*Brassica napus* L.) (Knight et al., 1994), Reis (*Oryza sativa* L.) (Impa et al., 2005), Sojabohne (*Glycine max* L.) (Gilbert et al., 2011b), Tomaten (*Solanum lycopersicum* L.) (Martin & Thorstenson, 1988, Galmés et al., 2011), Weizen (*Triticum aestivum* L.) (Farquhar & Richards, 1984, Ehdai et al., 1991) und Zuckerrübe (*Beta vulgaris* L.) (Rajabi et al., 2009) bestätigt.

Neben der Tatsache, dass $\Delta^{13}C$ Aussagen zur WUE von Genotypen zulässt, zeigte $\Delta^{13}C$ eine ausgeprägte genotypische Variation, eine hohe Stabilität über verschiedene Umwelten und hohe Heritabilitäten in vielen C_3 -Pflanzen, wie z.B. *Arabidopsis thaliana* (Juenger et al., 2005), Erdnuss (Hubick et al., 1988), Gerste (Ellis et al., 2002), Luzerne (*Medicago sativa*) (Johnson & Rumbaugh, 1995), Reis (Impa et al., 2005), Tomaten (Martin et al., 1999) und Weizen (Condon & Richards, 1992). Genomische Regionen (Quantitative Trait Loci, QTL), die $\Delta^{13}C$ beeinflussen, wurden bisher in dem Modellorganismus *Arabidopsis thaliana* (Hausmann et al., 2005, Juenger et al., 2005), Gerste (Handley et al., 1994, Ellis et al., 2002, Teulat et al., 2002, Chen et al., 2012), Reis (Takai et al., 2006, Takai et al., 2009, Xu et al., 2009), Tomate (Xu et al., 2008) und Weizen (Diab et al., 2008, Rebetzke et al., 2008, Wu et al., 2011) identifiziert. In *Arabidopsis thaliana* wurden zudem, ausgehend von den identifizierten QTL, bisher vier Gene kloniert, die $\Delta^{13}C$ beeinflussen. Zwei von diesen beeinflussen die stomatäre Leitfähigkeit (Masle et al., 2005; Nilson & Assmann, 2010), ein weiteres hat Auswirkungen auf die Zusammensetzung der Kutikula und auf die Transpiration (Lü et al., 2012). Das vierte in *Arabidopsis* klonierte Gen für $\Delta^{13}C$ kodiert für eine Untereinheit einer Cellulose-Synthase, und Mutationen in diesem Gen reduzieren $\Delta^{13}C$, wahrscheinlich aufgrund eines reduzierten Zellurgors in Folge einer reduzierten Wassertransport-Kapazität des Xylems (Liang et al., 2010).

Die Eignung von $\Delta^{13}C$ in der Selektion von wassernutzungseffizienten Sorten wurde in Weizen demonstriert. Da $\Delta^{13}C$ in Weizen hoch heritabel ist, einen sehr engen Zusammenhang mit der tatsächlichen WUE zeigt und deutlich schneller und an einer

großen Anzahl an Individuen erfasst werden kann, ist $\Delta^{13}\text{C}$ geeignet, um Sorten mit hoher WUE zu züchten (Condon et al., 2004). So entwickelte die „Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization“ (CSIRO) zusammen mit der „Australian National University“ zwei Weizensorten, „Rees“ und „Drysdale“, mit hoher WUE durch die Selektion auf geringes $\Delta^{13}\text{C}$ (Condon et al., 2002). Beide Sorten zeigten sich insbesondere in Regionen Ostaustraliens mit geringem bis mittlerem Niederschlag als äußerst erfolgreich und werden daher auch weiterhin als Eltern in der Züchtung neuer Sorten eingesetzt (IPAustralia, 2013).

1.2.3. Diskriminierung stabiler Kohlenstoffisotope in C_4 -Pflanzen

Die biochemischen Eigenschaften der RuBisCO erlauben ihr prinzipiell sowohl die Katalyse der Carboxylierung als auch die der Oxigenierung von Ribulose-1,5-bisphosphat, wobei die Affinität der RuBisCO zu CO_2 höher als zu O_2 ist (Ogren, 1984). In C_3 -Pflanzen müssen die in Folge der Oxigenierung von Ribulose-1,5-bisphosphat entstehenden und in höheren Konzentrationen toxischen Metaboliten während der Photorespiration im Pflanzenstoffwechsel unter Energieaufwendung (mindestens 2 ATP pro fixiertem CO_2) verarbeitet werden. Unter ungünstigen Bedingungen, wie hohen Temperaturen oder Wassermangel, kann die Photorespiration die Effektivität der Photosynthese in C_3 -Pflanzen um bis zu 40% reduzieren (Ehleringer et al., 1991). Einen Mechanismus, diese unerwünschte Eigenschaft der RuBisCO zu vermeiden, stellt die C_4 -Photosynthese dar. Der in C_4 -Pflanzen vorkommende Kohlenstoffzyklus ist dabei eine ausgeklügelte evolutionäre Erweiterung der C_3 -Photosynthese (Gowik & Westhoff, 2010). In den meisten Fällen erfolgt die C_4 - CO_2 Fixierung in räumlicher Trennung vom Calvin-Zyklus. In den Mesophyllzellen erfolgt die Hydratisierung von atmosphärischem CO_2 durch das Enzym Carboanhydrase und die anschließende Fixierung an Phosphoenolpyruvat durch das Enzym Phosphoenolpyruvatcarboxylase (PEPC). Das entstehende Oxalacetat wird unter Verbrauch von NADPH zu Malat oder Aspartat reduziert und diffundiert in die Bündelscheidenzellen. In den Bündelscheidenzellen wird dann das durch Decarboxylierung von Malat bzw. Aspartat freigesetzte CO_2 final durch die RuBisCO assimiliert (Leegood, 2002). Durch die Vorfixierung des CO_2 wird in den Bündelscheidenzellen und somit am Ort der RuBisCO Aktivität eine 10- bis 20-fach

erhöhte Konzentration von CO₂, verglichen mit der CO₂ Konzentration in den Mesophyllzellen, erreicht (Furbank & Hatch, 1987, Hatch, 1999) und dadurch die Photorespiration größtenteils unterbunden (Jenkins et al., 1989).

Aufgrund der Vorfizierung von CO₂ und der damit verbundenen künstlichen CO₂ Konzentrationserhöhung am Ort der RuBisCO ist die ¹³C Diskriminierung in C₄-Pflanzen deutlich geringer als in C₃-Pflanzen und kann durch

$$\Delta^{13}\text{C} = a + [b_4 + \phi \times (b_3 - s) - a] \times \frac{c_i}{c_a}$$

modelliert werden (Henderson et al., 1992). Dabei wird die Fraktionierung durch die PEPC während der Vorfizierung in den Mesophyllzellen sowie durch die vorrangende CO₂ Hydratisierung durch b_4 berücksichtigt. Ein Teil des durch die PEPC vorfizierten und in den Bündelscheidenzellen freigesetzten CO₂ wird nicht durch die RuBisCO assimiliert, sondern diffundiert zurück in die Mesophyllzellen. Das Verhältnis zwischen vorfiziertem CO₂ und dem, welches wieder zurück in die Mesophyllzellen diffundiert, wird als *leakiness* (ϕ) bezeichnet. Die Fraktionierung während ϕ wird durch s dargestellt, und b_3 bezeichnet die finale Fraktionierung durch die RuBisCO. Somit hängt $\Delta^{13}\text{C}$ in C₄-Pflanzen nicht nur von $c_i c_a^{-1}$ ab, sondern auch von ϕ , jedoch besteht auch in C₄-Pflanzen theoretisch ein linearer Zusammenhang zwischen $\Delta^{13}\text{C}$ und $c_i c_a^{-1}$, wobei die Steigung dieses Zusammenhangs von ϕ bestimmt wird. Theoretisch kann das Vorzeichen der Korrelation zwischen $\Delta^{13}\text{C}$ und $c_i c_a^{-1}$ positiv oder negativ sein, je nachdem, ob ϕ größer oder kleiner ist als $(a - b_4)b_3^{-1}$ (ca. 0,34) (Farquhar, 1983). Dieser theoretische Zusammenhang zwischen $\Delta^{13}\text{C}$ und $c_i c_a^{-1}$ in Abhängigkeit von der *leakiness* ist in Abbildung 1 dargestellt. Die ϕ kann bisher nicht direkt gemessen werden und muss daher indirekt geschätzt werden (Hatch et al., 1995, Ubierna et al., 2011, Bellasio & Griffiths, 2014). Für Mais wurden mit verschiedenen Methoden und unter unterschiedlichen Umweltbedingungen ϕ Werte zwischen 0,17 und 0,66 ermittelt (Hatch et al., 1995, Bellasio & Griffiths, 2014, Ubierna et al., 2013). Obwohl C₄-Pflanzen aufgrund der Vorfizierung generell eine höhere WUE aufweisen als C₃-Pflanzen (Lopes et al., 2011), gibt es Hinweise, dass auch in C₄-Pflanzen, wie Perlhirse (*Pennisetum glaucum*), Sorghum (*Sorghum bicolor*) und Mais eine interspezifische genotypische Variation für WUE besteht (Henderson et al., 1998, Brück et al., 2000, Zegada-Lizarazu & Iijima, 2005, Hund et al., 2009, Araus et al., 2010, Bunce, 2010, Kapanigowda et al., 2012). Um diese genotypische Variation in WUE züchterisch

nutzbar zu machen, wäre es sehr vorteilhaft $\Delta^{13}\text{C}$ als Indikator für die WUE in C_4 -Pflanzen nutzen zu können.

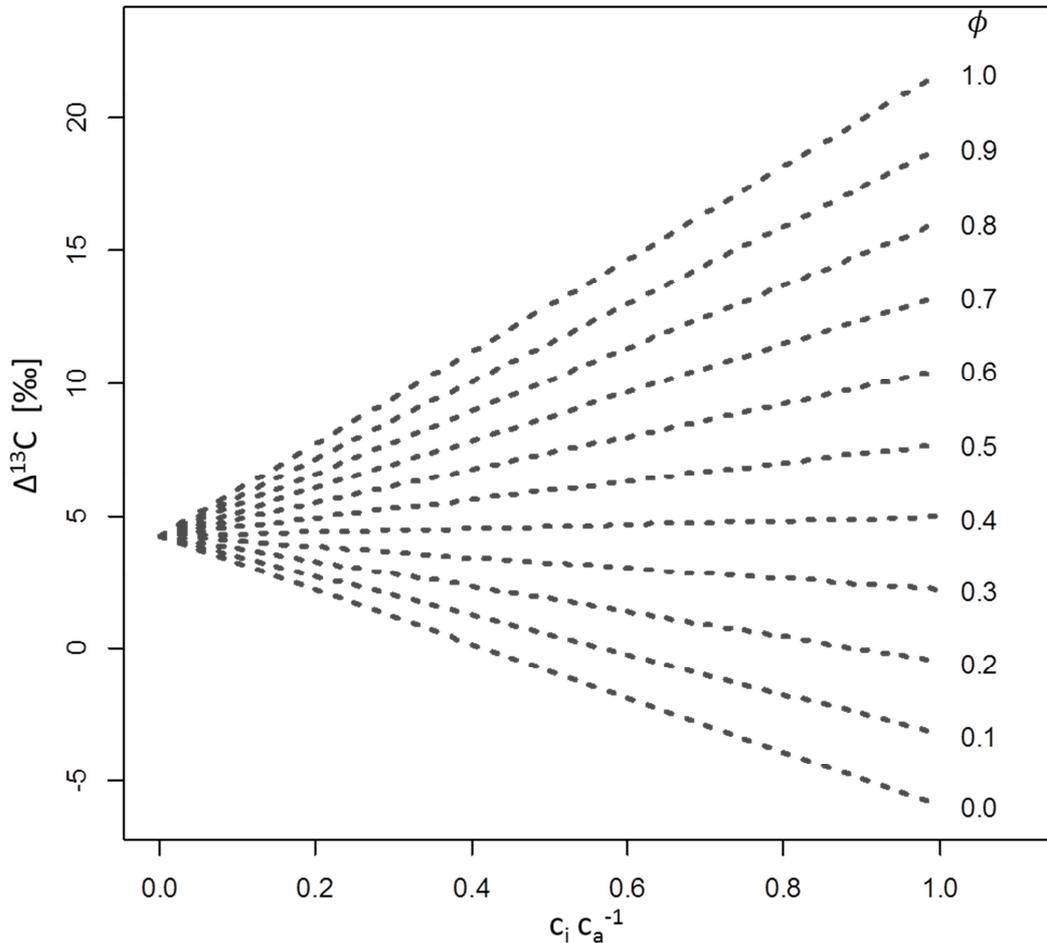


Abbildung 1. Der theoretische Zusammenhang zwischen der Kohlenstoffisotopen-diskriminierung ($\Delta^{13}\text{C}$) und dem Verhältnis zwischen der CO_2 Konzentration im substomatären Raum und der CO_2 Konzentration in der Atmosphäre ($c_i c_a^{-1}$) in Abhängigkeit von der *leakiness* (ϕ). Die Abbildung wurde abgeändert nach Farquhar (1983).

Verglichen mit C_3 -Pflanzen ist der Zusammenhang zwischen $\Delta^{13}\text{C}$ und WUE bzw. Trockenstresstoleranz in C_4 -Pflanzen jedoch bei weitem nicht so gut erforscht und bedarf weiterer Untersuchungen. Um dennoch $\Delta^{13}\text{C}$ prinzipiell als Merkmal für die indirekte Selektion von WUE Mais-Genotypen verwenden zu können, muss zunächst nachgewiesen werden, ob eine genotypische Variation für dieses Merkmal in der C_4 Spezies Mais existiert. In weiteren Schritten können dann Genomregionen identifiziert werden, die im Zusammenhang mit $\Delta^{13}\text{C}$ stehen, sowie die

biochemischen, physiologischen und morphologischen Ursachen für die genotypische Variation in $\Delta^{13}\text{C}$ analysiert werden. Introgressionsbibliotheken (IL) oder nah-isogene Linien („near isogenic lines“, NIL) sind durch ihren einheitlichen genetischen Hintergrund für derartige Untersuchungen besonders geeignet.

1.3. Introgressionsbibliotheken

Sowohl in der Genomforschung als auch in der Züchtungsforschung und in der angewandten Pflanzenzüchtung sind IL ein relativ neues Werkzeug. Dabei besteht eine IL aus mehreren Introgressionslinien (IL Linien), die aus einer bi-parentalen Kreuzung markergestützt entwickelt werden. Im Idealfall trägt jede IL Linie ein kleines, mit genomischen Markern definiertes, homozygotes Genomfragment (Donorgenomfragment) des einen Elters (Donor-Elter) im ansonsten homogenen Genom des anderen Elters (rekurrenter Elter). Jede IL Linie kann daher auch als NIL betrachtet werden, wobei über alle Linien einer IL betrachtet die Summe der einzelnen Donorgenomfragmente das komplette Genom des Donor-Elters abbilden soll (Eshed & Zamir, 1995). Neben dem Begriff IL werden für derartig definierte Populationen auch die Synonyme „chromosome segment substitution lines“ (z.B. Doi et al., 1997, Kubo et al., 2002, Ebitani et al., 2005, Ali et al., 2010), „recombinant chromosome substitution lines“ (Matus et al., 2003) oder „chromosome substitution strain“ (Shockley & Churchill, 2006) in der Literatur verwendet, wobei die im Folgenden beschriebenen Eigenschaften und möglichen Anwendungsgebiete für all diese Populationen zutreffen.

Neben ihrer Bedeutung in der Pflanzengenomforschung wurden IL oder dazu sehr ähnliche Ansätze auch in den tierischen Modellorganismen Maus (*Mus musculus*, Nadeau et al., 2000, Singer et al., 2004, L'Hôte et al., 2007) und der Nematode *Caenorhabditis elegans* (Doroszuk et al., 2009) erfolgreich verwendet.

1.3.1. Entwicklung von Introgressionsbibliotheken

Die Entwicklung einer IL ist verglichen mit der anderer bi-parentaler Kartierungspopulation, wie F_2 - (Doebley & Stec, 1993), RIL- (recombinant inbred lines, Groh et al., 1998) oder doppelt haploiden Populationen (DH, Lu et al., 1996), relativ zeitaufwendig und kann mehr als zehn Generationen dauern (Eshed & Zamir, 1994, Tian et al., 2005, Shim et al., 2010). Ausgehend von der Kreuzung des rekurrenten und des Donor-Elters wird zunächst über mehrere Zyklen der Rückkreuzung mit dem rekurrenten Elter der Anteil des Donorgenoms jeder Nachkommen-Linie reduziert. Dabei reduziert sich der Anteil des Donorgenoms je Rückkreuzungsschritt theoretisch um 50 %. Das Verhältnis der Anzahl der Allele des rekurrenten Elters zur Anzahl der Allele des Donor-Elters beträgt nach der ersten Rückkreuzung (BC_1) 75 : 25, in der BC_2 : 87,5 : 12,5, ..., BC_4 : 96,88 : 3,12 etc. (Fehr et al., 1987). Nach den Rückkreuzungsschritten werden die entsprechenden Rückkreuzungslinien wiederholt geselbstet, um vollständig homozygote Linien zu erhalten. Sowohl die Rückkreuzungen als auch die Selbstungen werden durch markergestützte Selektion begleitet, um Rekombinationsereignisse zu verfolgen und schließlich jene Nachkommen zu selektieren, die am geeignetsten sind, eine möglichst vollständige und homozygote IL zu bilden.

1.3.2. Detektion von QTL basierend auf Introgressionsbibliotheken

Obwohl die Entwicklung von ILs, wie beschrieben, mit einem hohen zeitlichen Aufwand verbunden ist, könnten ihre Vorteile im Vergleich zu den bisher gebräuchlicheren Kartierungspopulationen, wie F_2 -, RIL- oder BC_1 -Populationen, den Nachteil der aufwendigen Entwicklung mehr als ausgleichen. Einer der wichtigsten Vorteile von IL ist, dass mit ihnen die Komplexität polygen vererbter Merkmale, die den überwiegenden Teil der gesamten funktionellen Diversität in natürlichen Populationen ausmachen (Price, 2006), reduziert werden kann, indem diese komplexen Merkmale in monogene Effekte aufgeteilt und diese einzelnen Genombereichen zugeteilt werden (Peleman & van der Voort, 2003). Dadurch ist einerseits die Wahrscheinlichkeit größer, QTL mit kleineren Effekten zu detektieren, da deren Effekte nicht durch gleichzeitig in der Population spaltende QTL mit großem

Effekt („major QTL“) überlagert werden. Von besonderer Bedeutung ist diese Eigenschaft für die Identifikation von erwünschten Allelen aus exotischem, nicht angepasstem Material, da die Kopplung von einzelnen erwünschten Allelen mit meist einer Vielzahl unerwünschter Allele des exotischen Donor-Elters effektiv gebrochen wird (Zamir, 2001). Andererseits ermöglicht der einheitliche genetische Hintergrund des rekurrenten Elters die Analyse von epistatischen Effekten. Des Weiteren kann aufgrund der definierten genetischen Struktur der IL Linien jeder phänotypische Unterschied zwischen einer IL Linie und dem rekurrenten Elter klar einer Genomregion des Donor-Elters zugeordnet werden. Dabei können, in Abhängigkeit von der durchschnittlichen Donorgenomfragmentlänge je IL Linie, die Effekte meist einem kleineren Genombereich zugeschrieben werden als in der klassischen QTL Kartierung (Peleman & van der Voort, 2003). Nach der primären Identifikation von QTL, stellen die identifizierten IL Linien den Ausgangspunkt für die Entwicklung sogenannter subIL Linien (Törjék et al., 2008) dar. Diese Linien, die durch weitere Rückkreuzungen mit dem rekurrenten Elter entstehen, tragen kleinere Genomfragmente als die Ausgangs IL Linien und erlauben eine weitere physikalische Eingrenzung von Genomregionen sowie die Feinkartierung von QTL. Die komplette Homozygotie der IL Linien ermöglicht zudem deren dauerhafte Erhaltung. Daher stellen IL eine stabile, unsterbliche Ressource für die Genomforschung dar, die über viele Jahre, in wiederholten Experimenten und für viele Merkmale hochauflösend phänotypisiert werden kann (Peleman & van der Voort, 2003).

1.3.3. Introgressionsbibliotheken in der Analyse der genetischen Grundlagen von Epistasie und Heterosis

IL ermöglichen die genetischen und molekularen Ursachen von Epistasie und Heterosis zu untersuchen. Sowohl Epistasie, also die Interaktion zwischen zwei oder mehreren Genen, die einen Phänotyp bestimmt (Cordell, 2002), als auch Heterosis, die gesteigerte Produktivität von vegetativen und generativen Pflanzenteilen in Hybriden, verglichen mit deren Eltern (Darwin, 1876, Shull, 1908), sind zwei bedeutende Phänomene der quantitativen Genetik. Interaktionen zwischen verschiedenen Genen und deren gemeinsame Auswirkung auf die Phänotypen können, wie von Eshed et al. (1996) für Tomaten beschrieben, mit Hilfe von IL untersucht

werden. Dabei werden aus Kreuzungen einzelner IL Linien, die unterschiedliche Donorgenomfragmente tragen und jeweils einen additiven Effekt auf die phänotypische Ausprägung zeigten, Nachkommenlinien erstellt, die jeweils zwei Donorgenomfragmente tragen. Der phänotypische Vergleich der Nachkommenlinien mit zwei Donorgenomfragmenten mit den entsprechend ursprünglichen IL Linien (die jeweils nur eines der Donorgenomfragmente tragen) erlaubt Rückschlüsse über das Ausmaß und die Wirkung der Interaktion von Genen zwischen den zwei Donorgenomfragmenten. Eine Weiterentwicklung dieses Ansatzes wurde von Reif et al. (2009) in *Arabidopsis thaliana* erarbeitet und erprobt, wobei bei diesem Ansatz die Auswahl der ursprünglichen IL Linien für die Kreuzungen nicht mehr nur solche mit additivem Haupteffekt einschließt. Kreuzungen aus zwei IL Linien können auch für die QTL Pyramidisierung verwendet werden. So können entweder mehrere QTL mit erwünschtem Effekt auf ein phänotypisches Merkmal in einer Nachkommenlinie kombiniert werden, oder es können QTL für verschiedene Merkmale in einer Nachkommenlinie vereinigt werden (Ashikari & Matsuoka, 2006). Ashikari et al. (2005) nutzten diesen Ansatz in Reis, um einen QTL mit Einfluss auf die Pflanzenwuchshöhe und einen QTL mit Einfluss auf die Anzahl Körner je Pflanze in einer Linie zu kombinieren. In Tomaten kombinierten Gur & Zamir (2004) drei unabhängige QTL, die jeweils einen additiven Effekt auf den Ertrag in einer Tomaten Linie zeigten. Diese Linie wurde als Hybridelter direkt in der Sortenentwicklung eingesetzt.

Das Phänomen, dass Hybriden in Merkmalen, wie Ertrag, Wuchshöhe oder Stresstoleranz, ihren Eltern überlegen sind, wird als Heterosis bezeichnet. Zu den genetischen Ursachen für dieses Phänomen wurden mehrere Hypothesen, wie die Dominanz-, Überdominanz- oder Epistasie-Hypothese, entwickelt. Deren relative Bedeutung für die Ausprägung der Heterosis ist jedoch nicht abschließend geklärt (Lamkey & Edwards, 1999, Lippman & Zamir, 2007, Schön et al., 2010, Larièpe et al., 2012). Aufgrund der einzelnen Donorgenomfragmente im ansonsten einheitlichen Genom des rekurrenten Elters stellen IL ein hervorragendes Werkzeug für die Analyse der genetischen Ursachen der Heterosis dar. So können die meisten Hypothesen zur Ursache der Heterosis durch den Vergleich der IL Linien mit den jeweiligen F₁-Hybriden aus IL x rekurrenter Elter und IL x Donor-Elter überprüft werden (Semel et al., 2006, Melchinger et al., 2007).

1.3.4. Introgressionsbibliotheken in der praktischen Anwendung

Aufgrund der dargelegten Vorteile von IL und deren vielseitigen Anwendungsmöglichkeiten wurden innerhalb des letzten Jahrzehnts IL in einer Vielzahl von Pflanzenspezies entwickelt und für die Identifikation von QTL sowie deren genetischer Charakterisierung genutzt. Besonders umfangreiche Verwendung fanden IL dabei in Tomate, wobei die IL von Eshed & Zamir (1994) höchst wahrscheinlich die von allen IL am ausgiebigsten untersuchte darstellt. Diese IL, bestehend aus derzeit 76 IL Linien (Lippman et al., 2007), wurde aus der Kreuzung einer Kultursorte (*Solanum lycopersicum*, domestizierte Tomate) und einer Tomaten-Wildform (*Solanum pennellii*) entwickelt. Durch die äußerst umfangreiche Phänotypisierung dieser IL konnten bis zu 2.795 QTL für über hundert Merkmale der Pflanzenmorphologie, des Pflanzenmetaboloms, der Fruchtqualität und des Fruchtertrages identifiziert werden (zusammengefasst in Lippman et al., 2007). Weitere IL wurden in der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* (Keurentjes et al., 2007, Lisec et al., 2008, Törjék et al., 2008) und in den Kulturarten Gerste (Schmalenbach et al., 2008), Gemüsekohl (Ramsay et al., 1996), Kopfsalat (Jeuken & Lindhout, 2004), Melone (Eduardo et al., 2005, Eduardo et al., 2007), Pfeffer (Kargbo & Wang, 2010), Raps (Howell et al., 1996), Reis (z.B. Kubo et al., 2002, Mei et al., 2006, Zheng et al., 2007, Hao et al., 2009, Shim et al., 2010, Marzougui et al., 2011, Wang et al., 2013), Roggen (Falke et al., 2008), Weizen (Liu et al., 2006) und Mais (Szalma et al., 2007, Wang et al., 2007, Salvi et al., 2011, Gresset et al., 2014) entwickelt.

In Mais wurde die Verwendung von IL für die Identifikation und direkte züchterische Nutzung von QTL zunächst von Stuber et al. (1999) vorgeschlagen und erstmals von Szalma et al. (2007) praktisch umgesetzt. Diese erste Mais IL ging aus einer Kreuzung zweier amerikanischer Inzuchtlinien, B73 x Tx303, hervor (Flint-Garcia et al., 2005). Die Entwicklung der IL Linien erfolgte basierend auf 19 RFLP- (Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus) und 128 SSR- (simple sequence repeat) Markern. Es konnten 89 IL Linien identifiziert werden, die zusammen 89 % des Tx303 Genoms im Hintergrund des B73 Genoms abdeckten. In mehrjährigen Feldversuchen wurden QTL für den Zeitpunkt der weiblichen Blüte, der männlichen Blüte, sowie deren Synchronität in den IL Linien per se und in Hybriden identifiziert. Nahezu gleichzeitig wurden zwei weitere IL in China entwickelt. Diese sind über den

gemeinsamen Donor-Elter Hengbai522 (HB522) verbunden und wurden sowohl für die Identifikation von QTL für Wuchshöhe, Kolbenhöhe und die Stärkezusammensetzung im Maiskorn als auch für die Analyse der genetischen Ursachen der allgemeinen bzw. spezifischen Kombinationsfähigkeit genutzt (Wang et al., 2007, Bai et al., 2010, Qi et al., 2013). Ausgehend von einem in diesen IL detektierten QTL für Wuchshöhe konnten Teng et al. (2013) unter Verwendung von subIL Linien zeigen, dass diesem QTL zwei SNP zu Grunde liegen, welche die Transkription von *ZMGA3ox2* beeinflussen, das in Mais die Gibberellinsäure-3- β -hydroxylase kodiert. Salvi et al. (2011) entwickelten eine IL aus der amerikanischen Inzuchtlinie B73 und der Landsorte Gaspé Flint. Gaspé Flint gehört zum nordamerikanischen Hartmais – Genpool (Vigouroux et al., 2008) und stellt die Landsorte mit der kürzesten bekannten Generationszeit dar. Die extrem kurze Generationszeit von Gaspé Flint begründet sich hauptsächlich durch den QTL *Vgt1* (*Vegetative to generative transition1*, Vladutu et al., 1999, Salvi et al., 2002). Basierend auf der IL B73 x Gaspé Flint konnten neben *Vgt1* sieben weitere QTL detektiert werden, die die kurze Generationszeit von Gaspé Flint mit beeinflussen. Gleichzeitig konnte Ausgangsmaterial für deren Feinkartierung und Klonierung geschaffen werden, um neben dem „major QTL“ *Vgt1* zusätzliche QTL zu identifizieren, die die Dauer der Generationszeit beeinflussen (Salvi et al., 2011). Die besondere Eignung einer IL als Ausgangsmaterial für die QTL Feinkartierung und kartenbasierte Klonierung der den QTL zugrunde liegenden Gene über die relativ schnelle Entwicklung von subIL Linien wurde bereits in Tomate (Ronen et al., 2000, Tanksley, 2004, Fridman et al., 2004) und Reis (Takai et al., 2009) demonstriert.

Neben den bisher dargelegten Vorteilen von IL lassen deren spezifische Eigenschaften und hierbei insbesondere die Mendelisierung komplex vererbter und regulierter Merkmale, einen weiteren Vorteil in ihrer Anwendung vermuten. IL erscheinen als äußerst geeignet, um die Ursachen phänotypisch beobachteter Variation zu analysieren und in ihre einzelnen Komponenten aufzuteilen. Vor allem für schwierig zu phänotypisierende Merkmale, z.B. solche mit sehr geringem Durchsatz aufgrund aufwendiger oder teurer Messmethodik oder mit geringer genotypischer Varianz, wie es möglicherweise bei $\Delta^{13}\text{C}$ in C_4 -Pflanzen ist, stellen IL eine optimale Grundlage dar, um das Ausmaß des genotypischen Einflusses auf die phänotypische Variation zu bestimmen und gleichzeitig die detektierte genotypische Variation spezifischen Genombereichen zuzuordnen.

1.4. Ziele der vorliegenden Arbeit

Die spezifischen Ziele der vorliegenden Arbeit sind:

- I. Analyse der genotypischen Variation von $\Delta^{13}\text{C}$ unter optimalen Wachstumsbedingungen sowie unter Bedingungen mit suboptimaler Wasserverfügbarkeit in einer C_4 Spezies anhand einer Mais IL
- II. Schätzung der genotypischen Variation für Merkmale der Pflanzenentwicklung und Pflanzenphysiologie innerhalb einer Mais IL
- III. Quantifizierung der Abhängigkeit der $\Delta^{13}\text{C}$ Variation von genotypischen Unterschieden in der Pflanzenentwicklung bzw. Pflanzenphysiologie unter optimaler sowie suboptimaler Wasserverfügbarkeit
- IV. Identifikation von einzelnen Introgressionslinien, die sich in $\Delta^{13}\text{C}$ signifikant vom rekurrenten Elter unterscheiden
- V. Hochauflösende Genotypisierung der Mais IL mit dem Illumina MaizeSNP50 BeadChip und Identifikation der Donorgenomfragmente je Introgressionslinie
- VI. Etablierung und Bewertung von statistischen Verfahren für die Detektion von Assoziationen zwischen Donorgenomfragmenten und der phänotypischen Merkmalsausprägung innerhalb einer IL mit mehreren Donorgenomfragmenten je Introgressionslinie
- VII. Lokalisation von Genomregionen, welche die Ausprägung der stabilen Kohlenstoffisotopendiskriminierung beeinflussen sowie Schätzung von deren Effekten
- VIII. Analyse der Stabilität von $\Delta^{13}\text{C}$ über unterschiedliche Umwelten

Um diese Ziele zu erreichen wurde eine IL, entwickelt aus der Kreuzung einer Trockenstress-anfälligen und einer Trockenstress-toleranten Inzuchtlinie, in mehreren Umwelten hinsichtlich $\Delta^{13}\text{C}$ und Merkmalen der Pflanzenentwicklung und der Pflanzenphysiologie phänotypisiert. Es wurde untersucht, inwieweit $\Delta^{13}\text{C}$ in der IL genetisch bedingt ist und von Unterschieden in der Pflanzenentwicklung bzw. Pflanzenphysiologie abhängt. Zudem wurde die IL hochauflösend genotypisiert, um phänotypische Effekte in $\Delta^{13}\text{C}$ einzelnen Genomregionen zuordnen zu können.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Entwicklung der Introgressionsbibliothek

Die Introgressionsbibliothek wurde aus der Kreuzung der Zahnmaislinie IL-RE (Dent, rekurrenter Elter) mit der Hartmaislinie IL-DE (Flint, Donor-Elter) entwickelt (Abbildung 2 A). Beide Elite-Linien stammen aus dem aktuellen Zuchtprogramm des Saatzuchtunternehmens KWS SAAT AG (Einbeck, Deutschland), wobei IL-RE, adaptiert an südosteuropäische Klimabedingungen, spezifisch in der Körnermaiszüchtung und IL-DE, spezifisch in der Energiemaiszüchtung unter mitteleuropäischen Klimabedingungen verwendet wird. Aufgrund der Anpassung beider Linien an unterschiedliche Klimabedingungen ist neben der Diversität, basierend auf den unterschiedlichen Genpools (Zahmais, Hartmais) und Produktionsrichtungen, auch von unterschiedlichen Reaktionen hinsichtlich Trockenstresstoleranz auszugehen.

Um aus der Kreuzung dieser beiden Linien eine IL zu erstellen, wurden IL Linien mit definierten Donorgenomfragmenten in einem ansonsten homogenen genetischen Hintergrund mittels Rückkreuzung und Selbstung markergestützt entwickelt (Abbildung 3). Alle Nachkommen der Kreuzung wurden zunächst dreimal mit IL-RE rückgekreuzt. Entsprechend Abbildung A 1 (im Anhang) wurden 58 % der BC₃ Linien ein weiteres Mal mit IL-RE rückgekreuzt und anschließend drei bis fünf Selbstungsschritten unterzogen. Die verbleibenden 42 % der BC₃ Linien wurden direkt drei bis sechs Selbstungsschritten unterzogen. Während der Rückkreuzungs- und Selbstungsschritte wurde die Selektion von Linien mittels 226 SSR Markern durchgeführt.

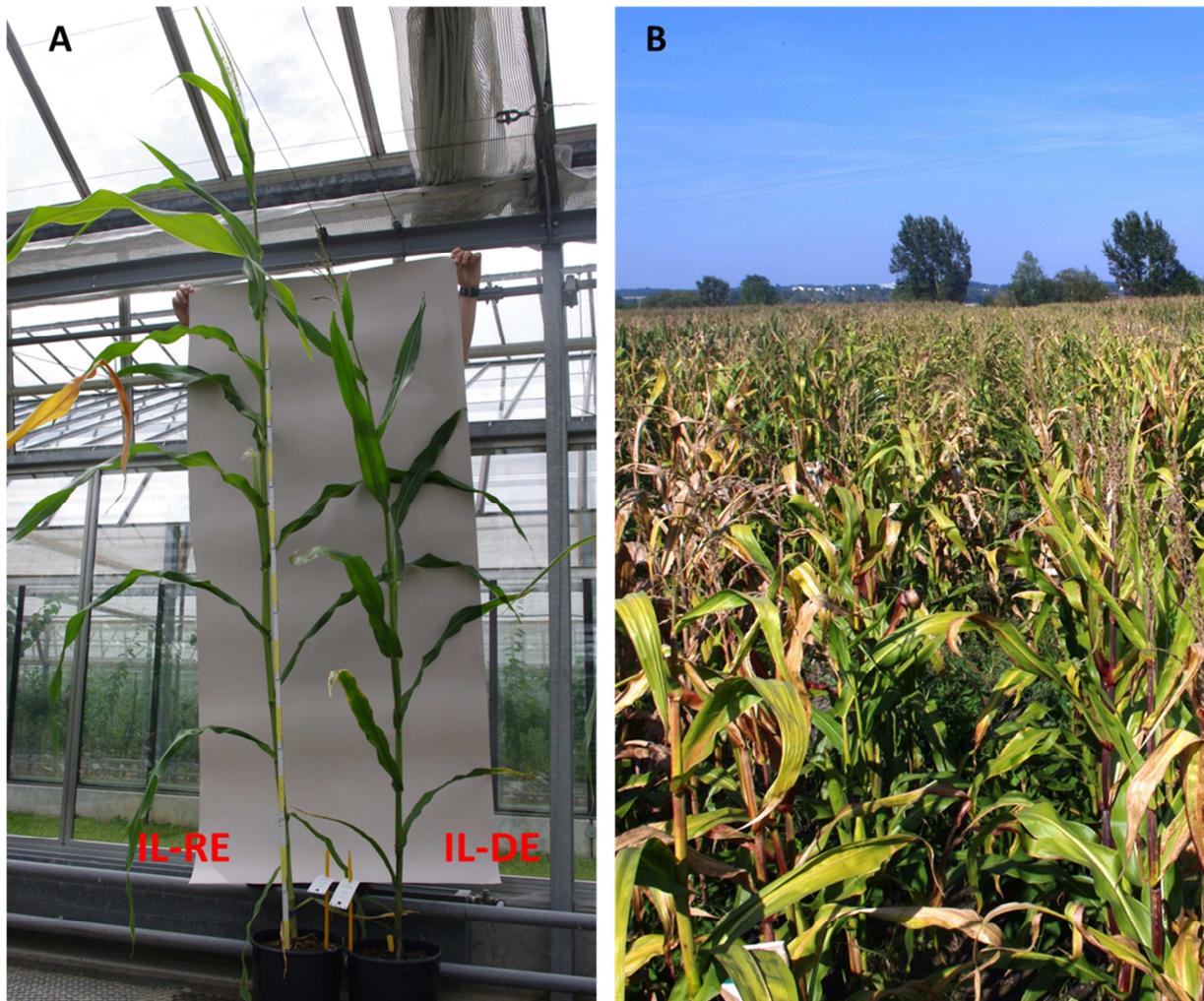


Abbildung 2 **A** Phänotypischer Vergleich der Eltern der Introgressionsbibliothek, IL-RE (linke Bildseite), IL-DE (rechte Bildseite) **B** Prüfung der 89 IL Linien und IL-RE im Feldversuch 2011.

Die SSR Marker Daten wurden von der KWS SAAT AG zur Verfügung gestellt. Abschließend wurden 89 IL Linien selektiert, welche möglichst ein einzelnes homozygotes Donorgenomfragment in einem ansonsten homogenen genetischen Hintergrund des rekurrenten Elters tragen und die Summe der einzelnen Donorgenomfragmente über alle 89 Linien möglichst das gesamte Donorgenom repräsentieren sollte.

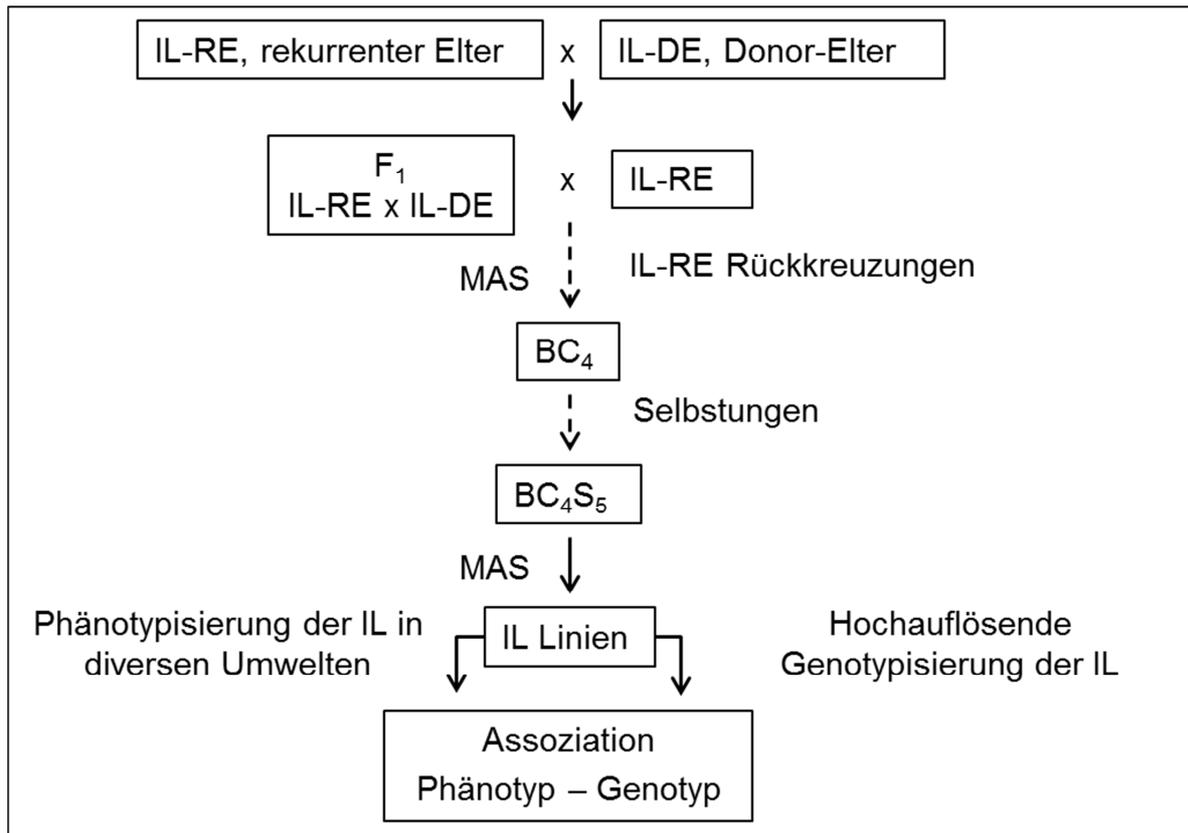


Abbildung 3 Schematische Darstellung der IL Entwicklung. Nach mehreren Rückkreuzungs- (BC) und Selbstungsschritten (S) wurden mittels markergestützter Selektion (MAS) IL Linien, hervorgegangen aus der Kreuzung IL-RE x IL-DE, selektiert.

2.2. Methoden

2.2.1. Genotypisierung der Introgressionsbibliothek

2.2.1.1. Hochauflösende Genotypisierung und Qualitätskontrolle

Für eine hochauflösende genetische Charakterisierung wurden die aus 89 Linien bestehende IL sowie jeweils sieben und vier biologische Replikate von IL-RE und IL-DE mittels des Illumina MaizeSNP50 BeadChip (Illumina Inc., San Diego, Kalifornien, USA) genotypisiert. Im Dreiblattstadium wurde Blattmaterial von Einzelpflanzen beprobt und DNS nach dem cetyl trimethylammonium bromid (CTAB) Protokoll (Saghai-Maroo et al., 1984) extrahiert. Nach der Extraktion wurde die DNS-Konzentration mit dem Epoch Take 3 Mikro-Volumen Spektralphotometer (Bio Tek Instruments GmbH, Bad Friedrichshafen, Deutschland) jeweils auf $75 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$ eingestellt. Der Illumina MaizeSNP50 BeadChip beinhaltet 56.110 Einzelnukleotid-Polymorphismus (SNP) Marker. Für 99,71 % der SNP ist die physikalische Position durch das Alignment gegen die B73 Referenzsequenz (B73 Refseq_v2, www.maizesequence.org) bekannt. Die Auswertung erfolgte mit der Genotypisierungssoftware GenomeStudio[®] v1.0 (Illumina Inc.). Dabei wurde die allgemein verfügbare Signalzuordnung (cluster file, Ganai et al., 2011) als Grundlage für die Separierung der SNP-Allele verwendet. Um die Eignung des Illumina MaizeSNP50 BeadChip für die Charakterisierung des spezifischen Materials (IL-RE, IL-DE) zu analysieren, wurden SNP mit einem Richtwert für die Ausfallsicherheit des SNP (GenTrain score) kleiner als 0,7 und einer Detektionshäufigkeit (call frequency) kleiner 0,9 sowie solche, welche nicht im internen CoreSet bzw. ohne Genompositionsangabe waren, aussortiert. Durch diese Vorselektion wurden SNP mit technisch bedingter geringer Qualität bzw. geringer statistischer Sicherheit aus dem Datensatz entfernt. Anhand der verbliebenen 32.194 SNP wurde getestet, inwieweit alle SNP jeweils an sieben biologischen Replikaten von IL-RE und vier biologischen Replikaten von IL-DE konsistent die gleichen Allele ergaben oder konsistent nicht ausgewertet (no call) werden konnten. Die unterschiedlichen Stichprobenzahlen an genotypisierten IL-RE und IL-DE Replikaten begründen sich dadurch, dass in einer ersten Genotypisierung von jeweils drei biologischen

Replikaten beider Inzuchtlinien die Replikate von IL-RE unterschiedliche Genotypen ergaben. Um die Ergebnisse dieser ersten Genotypisierung zu überprüfen, wurden vier weitere biologische Replikate von IL-RE und ein weiteres Replikat von IL-DE zusätzlich genotypisiert. Für die weitere Charakterisierung der gesamten IL wurde, um Daten höchster Qualität zu gewährleisten, ein GenTrain score von 0,9 und eine call frequency von 1,0 vorausgesetzt (Tabelle 1). Zudem wurden SNP aussortiert, die monomorph zwischen den Eltern bzw. in einem der Eltern nicht oder nicht konsistent ausgewertet werden konnten, sodass das finale Marker Set für die Charakterisierung der IL 1.861 SNP Marker umfasste. Aus der Analyse ausgeschlossen wurden kleine Donorgenomfragmente, die nur ein bis zwei SNP überspannten, aber identisch in mehreren IL Linien auftraten. Das Auftreten von mehreren unabhängigen Crossover in direkter Nachbarschaft erschien sehr unwahrscheinlich (Susic, 2005). Deshalb wurde angenommen, dass diese SNP, bedingt durch eine fehlerbehaftete Projektion der physikalischen Position auf die B73 Refseq_v2, falsch im Genom lokalisiert waren. Die Länge der einzelnen Donorgenomfragmente wurde über die Summe der auf dem Donorgenomfragment befindlichen SNP Abstände plus die Hälfte der Abstände zu den beidseitig flankierenden SNP ermittelt.

Tabelle 1 Markerselektion ausgehend von 56.110 SNP Markern des Illumina MaizeSNP50 BeadChip

Selektionsschritte	Anzahl ausgeschlossener SNP	Anzahl verbleibender SNP
gesamt		56.110
Genome Studio Ausgabe (GenTrain < 0.7, call frequency < 0.9)	-14.162	41.948
nicht im internen CoreSet ^a enthalten	-9.648	32.300
keine einheitliche Genomposition	-106	32.194 ^b
nicht zu analysieren in IL-RE oder IL-DE	-995	31.199
monomorph zwischen den Eltern	-19.694	11.505
call frequency \neq 1, GenTrain Score \leq 0.9	-9.644	1.861 ^c

^a TUM interne Auswahl an 32.650 SNP, die hoch reproduzierbare Ergebnisse in einem sehr diversen Set von Inzuchtlinien zeigten, ^b für die Analyse der Eignung des MaizeSNP50 BeadChip verwendet. ^c für die Charakterisierung der IL Linien verwendet

2.2.1.2. Statistische Auswertung der SNP Markerdaten

Die uniforme Verteilung aller 32.194 SNP über die 10 Mais Chromosomen (unter Berücksichtigung der jeweiligen Chromosomenlänge in bp) wurde mittels des Chi-Quadrat Tests bei einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ geprüft. Die unabhängige Verteilung der polymorphen SNP (11.505 SNP) über die Chromosomen wurde auf die gleiche Weise getestet.

Die Verteilung aller 32.194 SNP innerhalb der einzelnen Chromosomen und auch der insgesamt 11.505 zwischen IL-RE und IL-DE polymorphen SNP wurde überprüft, nachdem die SNP entsprechend ihrer Genompositionsangabe jeweils 10 Mb großen Abschnitten (Bin, Pea et al., 2013) zugeordnet wurden. Die erwartete Anzahl an SNP bzw. polymorphen SNP in jedem Abschnitt ergab sich aus dem Verhältnis zwischen Anzahl an Abschnitten und Anzahl an SNP bzw. polymorphen SNP je Chromosom. SNP, die dem letzten und somit unvollständigen Chromosomenabschnitt zugeordnet waren, wurden bei dem Test innerhalb der einzelnen Chromosomen nicht berücksichtigt. Um multiples Testen zu berücksichtigen, wurde ein globales Signifikanzniveau ($\alpha = 0,05$) durch die Kontrolle der falsch positiven Rate (false discovery rate, FDR) nach Benjamini & Hochberg (1995) gewährleistet.

2.2.2. Phänotypisierung der Introgressionsbibliothek

Die IL wurde im Feld, Gewächshaus und in Klimakammern phänotypisiert (Tabelle 2, Abbildung 2B). Dabei wurden neben der Kohlenstoffisotopendiskriminierung ($\Delta^{13}\text{C}$) phänotypische Merkmale erfasst, die eine Analyse ermöglichen, inwieweit die phänotypische und möglicherweise genotypische Variation in $\Delta^{13}\text{C}$ von Merkmalen der Pflanzenentwicklung abhängt. Zudem wurden pflanzenphysiologische Merkmale erhoben, die im Zusammenhang mit der allgemeinen Leistung der Genotypen hinsichtlich der Photosynthese und Reproduktion stehen, um deren Zusammenhang mit $\Delta^{13}\text{C}$ zu beleuchten.

Tabelle 2 Übersicht über die Feld-, Gewächshaus- und Klimakammerversuche

Plattform	Jahr	Versuchsdesign	Behandlung	IL Linien	phänotypische Merkmale ^b
Feld	2011	RCB ^a , drei Blöcke	optimale Wasserversorgung	89, IL-RE	$\Delta^{13}C_K$, BLW, BLM, WH, SenL, SPAD, $F_V F_M^{-1}$, AK
Gewächshaus	2011	RCB, sechs Blöcke	optimale Wasserversorgung	77, IL-RE	$\Delta^{13}C_K$, $\Delta^{13}C_B$, BLW, BLM, WH, SenL, SPAD, $F_V F_M^{-1}$
Gewächshaus	2012	RCB, sechs Blöcke	optimale und suboptimale Wasserversorgung	33, IL-RE IL-DE	$\Delta^{13}C_K$, BLW, BLM, WH, SenL, SPAD, BR, BT, AK
Klimakammer	2012	RCB, drei Blöcke	sieben Tage 10 °C und Dunkelheit, sieben Tage 25 °C 12 Std./Tag Licht	89, IL-RE, IL-DE	GV

^a vollständig randomisierte Blockanlage; ^b $\Delta^{13}C_K$, Kohlenstoffisotopendiskriminierung in den Körnern; $\Delta^{13}C_B$, Kohlenstoffisotopendiskriminierung in den Blättern; BLW, Anzahl Tage von Aussaat bis zur weiblichen Blüte; BLM, Anzahl Tage von Aussaat bis zur männlichen Blüte; WH, Wuchshöhe; SenL, Anzahl seneszenten Blätter; SPAD, Chlorophyllgehalt des Kolbenblattes; $F_V F_M^{-1}$, maximale Photosynthesekapazität; BR, Blattrollen, BT, Oberflächentemperatur des Kolbenblattes; AK, Anzahl Körner je Pflanze; GV, Keimlingstriebkraft

2.2.2.1. Versuchsdesign und Wachstumsbedingungen

Feldversuch 2011

Der Feldversuch (Feld), bestehend aus 89 IL Linien sowie dem rekurrenten Elter IL-RE, wurde am 20. April 2011 in Freising (N 48.374981, E 11.706165) mit einem Parzellen-Einzelkornsäugerät (Plots spider, Wintersteiger, Ried Österreich) ausgesät. Das Saatgut wurde vorab mit 90 % Cruiser 350 FS und 10 % Maxim XL (Syngenta Agro, Maintal, Germany) gebeizt. Der Versuchsplan entsprach einer vollständig randomisierten Blockanlage (RCB) mit drei Blöcken. Jede Parzelle entsprach einer Reihe von 3 m Länge mit einem Pflanzenabstand in der Reihe von 0,12 m und zwischen den Reihen von 0,75 m. Dies erbrachte eine Saatedichte von ca. 11 Pflanzen m⁻². Düngung und Herbizid-Applikationen erfolgten nach guter fachlicher Praxis. Gedüngt wurde an drei Terminen. Vor der Aussaat wurden 80 kg ha⁻¹ Stickstoff (N), 50 kg ha⁻¹ Phosphor (P) und 80 kg ha⁻¹ Kalium (K) appliziert. Während

der Aussaat erfolgte eine Unterfußdüngung mit 30 kg ha⁻¹ N, 30 kg ha⁻¹ P und 25 Tage nach der Saat wurden weitere 70 kg ha⁻¹ N ausgebracht. Der Bodentyp am Versuchsstandort entsprach einem sandigen Lehm mit einem pH-Wert von 7,4. Die wöchentliche Durchschnittstemperatur in der Vegetationszeit von Mai bis September am Versuchsstandort lag zwischen 9 °C und 21 °C. Die wöchentliche Niederschlagsmenge betrug zwischen 24 mm und 76 mm. Die Erfassung aller phänotypischen Merkmale erfolgte im Feld als Mittelwert von mindestens drei Einzelpflanzen je Parzelle.

Gewächshausversuch 2011

Die hochauflösende Genotypisierung aller 89 IL Linien zeigte, dass mehrere Linien teilweise noch heterozygote Donorgenomfragmente aufwiesen. Daher wurde im Gewächshaus 2011 (GWH11) eine Auswahl an 77 homozygoten IL Linien sowie IL-RE am 21. Februar 2011 in einem RCB mit sechs Blöcken unter optimalen Wachstumsbedingungen geprüft. Jeweils zwei Körner je Prüfglied wurden in einem mit Torfsubstrat (Floradur Pot coars, pH 4,8, 221,0 mg l⁻¹ N, 24,5 mg l⁻¹ P₂O₅, 260,5 mg l⁻¹ K₂O, Floragard Vertriebs GmbH, Oldenburg, Deutschland) gefüllten Topf (30 l Volumen) in einem Gewächshaus des Gewächshauslaborzentrums Dürnast der Technischen Universität München (TUM) in Freising-Weihenstephan (N 48.405001 E 11.689592) ausgesät und im Dreiblattstadium auf eine Pflanze je Topf vereinzelt. Über die Phase des vegetativen Wachstums verteilt wurden je Topf 1 g Basisdünger (Ferty 3, Planta Düngermittel GmbH, Regenstauf, Deutschland) appliziert. Die tägliche Bewässerung auf 95 % der Feldkapazität erfolgte über eine automatisierte Tröpfchenbewässerung. Die Wachstumsbedingungen im Gewächshaus waren wie folgt: Tagesdurchschnittstemperatur 24 °C, relative Luftfeuchtigkeit 49 %. Die durchschnittliche Nachttemperatur betrug 18 °C mit einer relativen Luftfeuchtigkeit von 65 %. Die durchschnittliche Globalstrahlung im Versuchszeitraum betrug 4594 Wh m⁻². Die Erfassung der phänotypischen Merkmale erfolgte auf Basis je einer Einzelpflanze pro Block.

Gewächshausversuch 2012

Ausgehend von den Ergebnissen der vorangegangenen Versuche kamen im Gewächshaus 2012 (GWH12) eine Auswahl von 33 IL Linien sowie die Eltern der IL zur Aussaat. Selektiert wurden IL Linien, die bereits im Feld bzw. im GWH11 einen

signifikanten Effekt in $\Delta^{13}\text{C}_\text{K}$ zeigten. Zu diesen wurden weitere Linien ausgewählt mit dem Ziel, trotz einer reduzierten Anzahl an IL Linien einen möglichst großen Teil des Donorgenoms abzudecken. Die Aussaat von je zwei Körnern je Prüfglied (je IL Linie und Wiederholung) erfolgte am 3. April 2012. Töpfe, Pflanzsubstrat, Düngung und Vereinzeln entsprachen dem im Gewächshausversuch 2011 beschriebenen Versuchsaufbau. Das Versuchsdesign war ein RCB mit sechs Blöcken je Behandlung. Die Behandlungen bestanden aus einer optimalen (GWH12_opt) und einer suboptimalen (GWH12_sub) Bewässerung, wobei GWH12_sub durch graduelle Reduktion der täglichen Wasserzufuhr vor Einsetzen der männlichen Blüte induziert wurde. GWH12_sub wurde bis zum Beginn der Kornfüllphase beibehalten und anschließend durch Rückbewässerung beendet. Die Abreife erfolgte in beiden Behandlungen unter optimaler Wasserverfügbarkeit. Der Verlauf des Bodenwassergehaltes zwischen Sechsstadium (EC 16) und Milchreifestadium (EC 75), gemessen mit „10HS Large Volume VWC“ Sensoren (Decagon Dev. Inc. Pullman, USA), ist in Abbildung 4 dargestellt. Bereits vier Tage nach Beginn der Trockenstresssimulation am 12.05.2012 lag der relative Wassergehalt in GWH12_sub bei 15 Vol.-%, sank bis zum Einsetzen der männlichen Blüte auf 6,67 Vol.-% und schwankte bis zum Ende der männlichen Blüte zwischen 4,33 und 9,91 Vol.-%. Somit konnte die der Versuchsplanung entsprechende Wasserreduktion auf 5 bis 10 Vol.-% im Zeitraum der Blüte erzielt werden. Im Anschluss wurde die Bewässerung auf ca. 95 % der nutzbaren Feldkapazität (nFk) graduell erhöht und auf diesem Niveau fortgeführt. In der GWH12_opt schwankte der Wassergehalt während des gesamten Messzeitraums zwischen 18,63 und 26,39 Vol.-%. Die Wachstumsbedingungen im GWH12 waren wie folgt: Tagesdurchschnittstemperatur 24 °C, relative Luftfeuchtigkeit 46 %. Die durchschnittliche Nachttemperatur betrug 17 °C mit einer relativen Luftfeuchtigkeit von 71 %. Die durchschnittliche Globalstrahlung im Versuchszeitraum betrug 5084 Wh m⁻². Die Erfassung der phänotypischen Merkmale erfolgte an Einzelpflanzen.

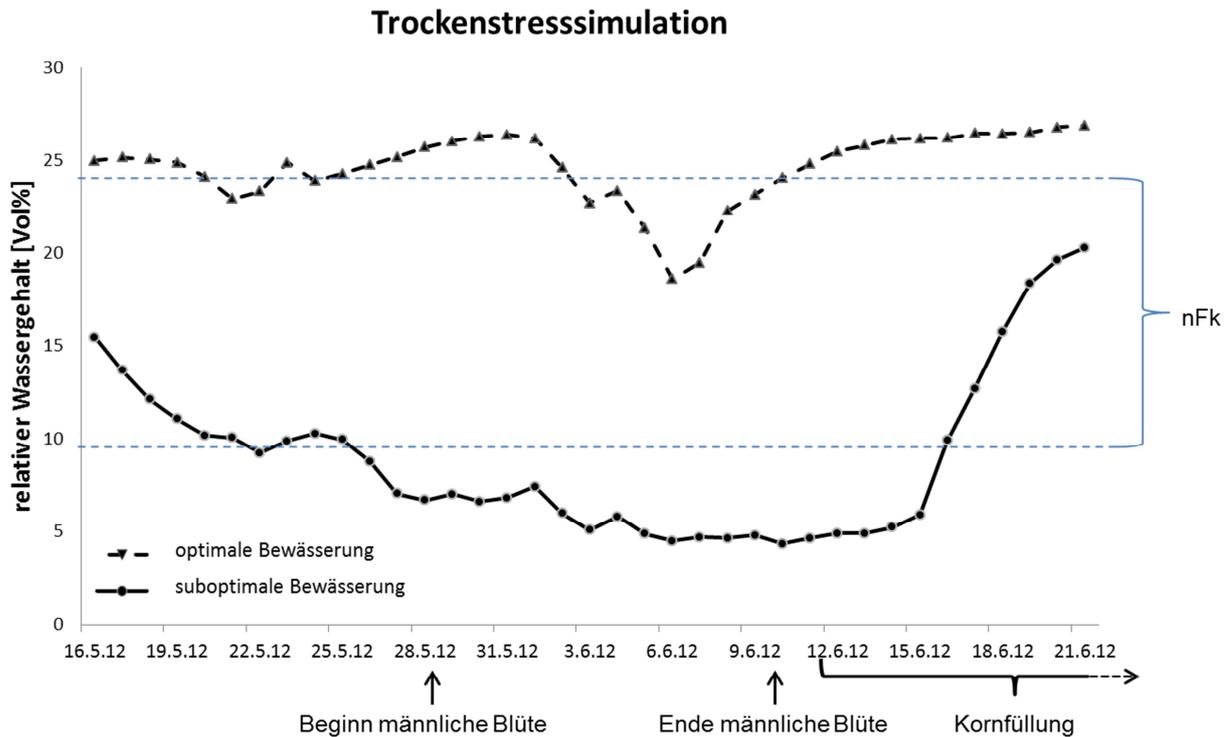


Abbildung 4 Entwicklung des Bodenwassergehaltes in Relation zur nutzbaren Feldkapazität (nFK) als Mittelwert über jeweils 15 10HS Bodensensoren in der Behandlung mit optimaler und suboptimaler Bewässerung im Gewächshausversuch 2012.

Klimakammerversuch 2011

Körner aller 89 IL Linien und der Eltern der IL wurden in einer Klimakammer auf Unterschiede in der Triebkraft untersucht. Das Versuchsdesign entsprach einem RCB mit drei Blöcken und 25 Körnern je Genotyp und Block, das Testverfahren entsprach dem von Khajeh-Hosseini et al. (2009). Erde (sandiger Lehm, pH 6,5-7,0) wurde auf 2 mm Korngröße gesiebt, auf 65 % der Feldkapazität aufgewässert und auf drei Schichten Filterpapier ausgebracht. Das gebeizte Saatgut wurde in gleichmäßigen Abständen auf der Erdschicht verteilt, zusammen mit dem Filterpapier aufgerollt und in oben offenen Plastikbeuteln verpackt, um ein Austrocknen während des Versuches zu verhindern. Die Saatgutrollen verblieben zunächst für sieben Tage bei 10 °C und 24 Std. Dunkelheit und anschließend weitere sieben Tage bei 25 °C und 12 Std. Beleuchtung in Klimakammern. Nach Öffnen der Saatgutrollen wurde der Anteil an normal entwickelten Keimlingen entsprechend den ISTA (International Seed Testing Association, 2009) Vorgaben bestimmt.

2.2.2.2. Erfassung phänotypischer Merkmale

Messung des stabilen Kohlenstoffisotopen Verhältnisses

Die $\Delta^{13}\text{C}$ Analysen erfolgten an Korn- und Blattmaterial. Zur Analyse des Kornmaterials wurden nach der physiologischen Reife 20 Körner im Gewächshaus (GWH11 und GWH12) von Einzelpflanzen und im Feld von einer Parzelle zufällig beprobt. Die Proben wurden bei 54 °C 48 Std. im Trockenschrank getrocknet und anschließend mit einer Rotormühle (Brabender GmbH & Co. KG, Duisburg, Deutschland) auf 0,5 mm vermahlen. Im Versuch GWH11 wurden von drei der insgesamt sechs Wiederholungen zudem die Kolbenblätter beprobt. Diese wurden ebenfalls zunächst bei 54 °C für 48 Std. getrocknet und anschließend mit einer Rotormühle (Brabender GmbH & Co. KG, Duisburg, Deutschland) unter Verwendung eines 1,5 mm Siebes zerkleinert. Das Verhältnis der stabilen Kohlenstoffisotope in den Proben (Blätter und Körner) wurde jeweils anhand einer homogenisierten Teilprobe (1 mg Aliquot) mittels eines an ein Isotopenverhältnis Massenspektrometer (Delta Plus, Thermo Finnigan MAT, Bremen, Deutschland) gekoppeltes (Conflo III, Finnigan MAT, Bremen, Deutschland) Elementaranalysegerätes (NA1110, Carlo Erba Instruments, Mailand, Italien) ermittelt. Jede Probe wurde im Verhältnis zu einem gasförmigen Arbeitsstandard gemessen, der zuvor auf sekundäre Isotopen Standards (IAEA-CH6, Genauigkeit ± 0.06 ‰ SD) kalibriert wurde. Nach jeder zehnten Probe wurde ein Laborstandard gemessen, um die Präzision der Isotopenanalyse zu gewährleisten (± 0.25 ‰ SD Langzeitpräzision). Das $^{13}\text{C} \text{ }^{12}\text{C}^{-1}$ Isotopenverhältnis wurde gegen den internationalen Standard Pee Dee Belemnite berechnet:

$$\delta^{13}\text{C} [\text{‰}] = \left(\frac{R_{\text{Probe}}}{R_{\text{Standard}}} - 1 \right) \times 1000$$

Dabei stellt R_{Probe} das Verhältnis $^{13}\text{C} \text{ }^{12}\text{C}^{-1}$ des Pflanzenmaterials der jeweiligen Probe und R_{Standard} das Verhältnis des Standards dar. Aus den $\delta^{13}\text{C}$ Werten wurde die Kohlenstoffisotopendiskriminierung ($\Delta^{13}\text{C}$) durch

$$\Delta^{13}\text{C} [\text{‰}] = \frac{\delta_{\text{l}} - \delta_{\text{p}}}{1 + \frac{\delta_{\text{p}}}{1000}}$$

berechnet, wobei δ_p das $\delta^{13}\text{C}$ des Pflanzenmaterials der jeweiligen Probe und δ_i das durchschnittliche $\delta^{13}\text{C}$ der Atmosphäre ($\delta_i = -8 \text{ ‰}$, Farquhar et al., 1989) ist. Es wurde in allen Versuchen ein konstantes δ_i angenommen.

Messung der Merkmale der Pflanzenentwicklung

Um mögliche Zusammenhänge zwischen der Ausprägung von $\Delta^{13}\text{C}$ und der Pflanzenentwicklung zu analysieren, wurden die entwicklungsbeschreibenden Merkmale weibliche Blüte (BLW), männliche Blüte (BLM), Wuchshöhe nach der Blüte (WH) und Abreife (SenL, "senescent leaves"), sowohl im Feld als auch in beiden Gewächshausversuchen erfasst. Das Merkmal der Keimlingstriebkraft (GV, "germination vigor") wurde in einem Klimakammerexperiment untersucht. Im Feld wurde BLW und BLM als die Anzahl an Tagen von der Aussaat bis zu dem Zeitpunkt, an dem mindestens an 50 % der Pflanzen einer Parzelle die Narbenfäden bzw. Staubbeutel sichtbar waren, gemessen. In GWH11 und GWH12 wurde BLW und BLM als die Anzahl an Tagen von der Aussaat bis zu dem Zeitpunkt, an dem an den jeweiligen Einzelpflanzen die Narbenfäden bzw. Staubbeutel sichtbar waren, ermittelt. Die Wuchshöhe nach der Blüte wurde als Abstand in Zentimetern zwischen der Bodenoberfläche und dem untersten Seitenast der Fahne als Mittel über drei Pflanzen einer Parzelle (Feld) und an individuellen Pflanzen im Gewächshaus (GWH11, GWH12) erfasst.

Als Maß für den Grad des Abreifeprozesses wurde das Merkmal SenL erfasst. Hierzu wurde 20 Tage nach Ende der Blüte im Mittel über drei Pflanzen einer jeden Parzelle (Feld) das Verhältnis an braunen Blättern zu der Gesamtzahl an Blättern bestimmt. Dieses Merkmal wurde im Gewächshaus (GWH11, GWH12) als das Verhältnis von braunen Blättern zu der Gesamtzahl der Blätter einer einzelnen Pflanze ermittelt.

Das in Klimakammern geprüfte Merkmal GV wurde entsprechend den von der ISTA (International Seed Testing Association, 2009) empfohlenen Standards erfasst. Als Maß für die Triebkraft des Keimlings in Prozent wurde das Verhältnis normal entwickelter Keimlinge zu der Gesamtzahl an getesteten Körnern herangezogen.

Messung der Merkmale der Pflanzenphysiologie

Sowohl unter optimalen Wachstumsbedingungen (Feld, GWH11 und GWH12_opt) als auch unter Bedingungen mit suboptimaler Wasserverfügbarkeit (GWH12_sub) wurden Merkmale der Pflanzenphysiologie erfasst, d.h. solche, die im

Zusammenhang mit Photosynthesekapazität, reproduktivem Erfolg und Trockenstresstoleranz stehen, um deren Assoziation mit $\Delta^{13}\text{C}$ zu analysieren.

Eine direkte Erfassung der tatsächlichen Photosynthesekapazität mittels Gaswechselformung ist sehr zeitaufwendig und bei einer großen Zahl an Prüfgliedern nicht praktikabel. Daher wurden die Merkmale Chlorophyllgehalt des Kolbenblattes (SPAD) und die effektive Quantenausbeute des Photosystem II ($F_vF_M^{-1}$) erhoben, die mit der Photosynthesekapazität assoziiert sind (Fracheboud et al., 2004, Kim et al., 2013) und gleichzeitig an einer großen Zahl an Prüfgliedern erfasst werden können. SPAD wurde in allen Feld- und Gewächshausversuchen erfasst. SPAD wurde als das Mittel über 10 Messungen mittels eines Chlorophyll Meter SPAD-502 (Single-Photon Avalanche Diode, Konica Minolta Sensing Inc., Sakai, Osaka, Japan) am Kolbenblatt quantifiziert. $F_vF_M^{-1}$ wurde im Rahmen des Feld- und des GWH11-Versuches ermittelt. Nach Jompuk et al. (2005) wurde $F_vF_M^{-1}$ mittels eines Puls-Amplituden-Modulierten Fluorometers (Junior-PAM, Heinz Walz GmbH, Effeltrich, Deutschland) einen Tag nach den SPAD Messungen an denselben Blättern gemessen. $F_vF_M^{-1}$ wurde gemessen, indem die jeweiligen dunkeladaptierten (Beginn der Messungen 2 Std. nach Sonnenuntergang) Kolbenblätter für eine Sekunde mit einem saturierenden Lichtblitz ($> 8000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) beleuchtet wurden. Im Feld basieren diese Messungen auf dem Mittel aus fünf Pflanzen je Parzelle und in GWH11 auf Einzelpflanzen.

Für die Bestimmung des reproduktiven Erfolgs wurden alle Kolben einer Parzelle (Feld) bzw. Einzelpflanze (GWH12) nach der physiologischen Reife geerntet, die Körner mittels eines Einzelkolbendreschers (Agricullex SCS-2, Guelph, Kanada) gedroschen und die Anzahl der Körner je Pflanze (AK) ermittelt.

Im GWH12 wurden als zusätzliche trockenstressspezifische Merkmale die Synchronität der männlichen und weiblichen Blüte (Anthesis-Silk Intervall, ASI), das Blattrollen (BR) und die Oberflächentemperatur des Kolbenblattes (BT) ermittelt.

ASI in Tagen wurde nach Bänzinger et al. (2000), basierend auf den Bonituren der weiblichen (BLW) und männlichen Blüte (BLM), durch $\text{ASI} = \text{BLW} - \text{BLM}$ berechnet. BR wurde nach einer visuellen Boniturskala (Bänzinger et al., 2000) als das Mittel über je zwei Bonitur-Termine vor und zwei Termine nach der Blüte erfasst. BT in $^{\circ}\text{C}$ wurde an zwei Terminen, jeweils zwischen 11 Uhr und 15 Uhr an warmen ($> 25 \text{ }^{\circ}\text{C}$) wolkenlosen Tagen mittels eines Infrarotthermometers (Scantemp 490, Carl Roth

GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) als Mittelwert über drei Messungen eines jeden Kolbenblattes erfasst.

2.2.2.3. Statistische Auswertung der Feld-, Gewächshaus- und Klimakammerversuche

Die Feld-, beide Gewächshausversuche und der Klimakammerversuch wurden mit gemischten linearen Modellen ausgewertet. Ausreißer wurden basierend auf extrem vom Mittelwert abweichenden standardisierten Residuen nach Grubbs (1950) identifiziert und aus dem Datensatz entfernt. Die Varianzanalysen wurden in R (R Development Core Team, 2012) entsprechend Falke et al. (2009) mit folgendem linearen Modell durchgeführt.

$$Y_{ivj} = \mu + G_i D + E_v + B_{jv} + C + (GE)_{iv} D + (CE)_{v} + e_{ivj}$$

Dabei repräsentiert Y_{ivj} die Beobachtung des Merkmals Y in einer Parzelle (Feld) bzw. Einzelpflanze (GWH11, GWH12), μ ist die Bezeichnung des Gesamtmittelwertes, G_i bezeichnet den Effekt der Linie i ($i = 1, \dots, 90$ im Feld, $i = 1, \dots, 78$ in GWH11 und $i = 1, \dots, 34$ im GWH12), E_v repräsentiert den Effekt der Umwelt v (Feld, GWH11) bzw. der Behandlung in GWH12 (GWH12_opt, GWH12_sub), B_{jv} stellt den Effekt des jeweiligen Blockes j ($j = 1, \dots, 3$ im Feld, $j = 1, \dots, 6$ in beiden Gewächshausversuchen) innerhalb der Umwelt v dar und e_{ivj} bezeichnet den Versuchsfehler. D ist eine Dummy-Variable und C wurde als Klassifikationsvariable in das Modell aufgenommen. Beide Variablen haben jeweils eine Stufe für den rekurrenten Elter IL-RE ($D = 0$; $C = 1$) und eine für die IL Linien ($D = 1$; $C = 2$) (Falke et al., 2009). E_v , C und die Interaktion $(CE)_v$ wurden als fix und die verbleibenden Effekte als zufällig angenommen. Der Donor-Elter IL-DE wurde in der Varianzanalyse nicht berücksichtigt. In der Analyse der einzelnen Umwelten (Feld, GWH11, GWH12_opt, GWH12_sub) wurden der Effekt E_v und alle Interaktionen, die diesen Effekt beinhalten, vom Modell ausgeschlossen.

Die Schätzwerte der genotypischen (σ^2_g) und der Genotyp-Umwelt Interaktion (σ^2_{ge}) Varianzkomponenten sowie des Restfehlers (σ^2) wurden mittels *restricted maximum likelihood* (REML), implementiert im R Paket *lme4* (Bates & Maechler, 2012), berechnet. Die besten linearen unverzerrten Prädiktoren (Best Linear Unbiased

Predictors, BLUP) der Genotypen wurden nach Garrick et al. (2009) deregressiert, um adjustierte Mittelwerte der Genotypen zu erhalten.

Um signifikante phänotypische Unterschiede zwischen IL Linien und dem rekurrenten Elter zu identifizieren, wurden zweiseitige Dunnett Tests (Dunnett, 1955), implementiert im *multcomp* R Paket (Hothorn et al., 2008), durchgeführt. Dabei wurde eine Typ I Fehlerrate von $\alpha = 0,05$ verwendet. Für die Berechnung der Dunnett Teststatistik wurden die Dummy-Variable D und die Klassifikationsvariable C aus dem linearen Modell ausgeschlossen und G_i sowie gegebenenfalls die Interaktion $(GE)_{iv}$ als fixe Faktoren betrachtet.

Die Heritabilitäten der phänotypischen Merkmale wurden auf der Grundlage der Mittelwerte der Prüfglieder (entry-mean heritability) nach Holland et al. (2003) berechnet:

$$h^2 = \frac{\sigma_g^2}{\sigma_g^2 + \frac{\sigma_{ge}^2}{E} + \frac{\sigma^2}{R_{E1} + R_{E2}}}$$

Dabei steht E für die Anzahl an Umwelten (Feld, GWH11) bzw. in GWH12 für die beiden Behandlungen, R_{E1} bezeichnet die Anzahl an Wiederholungen in Umwelt eins und R_{E2} bezeichnet die Anzahl an Wiederholungen in Umwelt zwei.

Phänotypische Korrelationen zwischen Merkmalen wurden als Pearsons lineare Korrelationskoeffizienten mittels der R Funktion *cor.test* (R Development Core Team, 2012) geschätzt. Um multiples Testen zu berücksichtigen, wurden alle phänotypischen Korrelationen bei $P < 0,01$ als signifikant betrachtet.

2.2.3. Simulationsstudie und Identifikation von Genomregionen mit Einfluss auf die phänotypische Ausprägung

2.2.3.1. Identifikation von Zielregionen mit Assoziation zwischen Phänotyp und Genotyp

Für die Identifikation von Genomregionen mit signifikantem Einfluss auf phänotypische Merkmale wurde die ausgeprägte Kollinearität bedingt durch identische SNP Allele auf den jeweiligen Donorgenomfragmenten reduziert. Hierzu wurden alle Donorgenomfragmente innerhalb der IL entsprechend Falke & Frisch (2011) in einzelne Zielregionen (Abbildung 5) unterteilt. Für alle 89 IL Linien wurden

177 Zielregionen in der IL detektiert. Den 177 Zielregionen wurden entsprechend ihrer Genomposition (beginnend auf Chromosom 1 (1 b) und endend mit Chromosom 10 (148,9 Mb)) fortlaufende Identifikationsnummern ($ID_{89IL} = 1, \dots, 177$) zugeordnet. Die 77 IL Linien, die sowohl im Feld als auch im Gewächshausversuch 2011 getestet wurden, enthielten 164 Zielregionen ($ID_{77IL} = 1, \dots, 164$). Auf der Basis von 33 IL Linien, die im GWH12 getestet wurden, konnten 92 Zielregionen identifiziert werden ($ID_{33IL} = 1, \dots, 92$).

Schätzwerte für das Kopplungsphasenungleichgewicht (LD) zwischen allen Zielregionen wurden nach Hill & Robertson (1968) berechnet als:

$$r^2 = \frac{D_{vw}^2}{p_v(1 - p_v)p_w(1 - p_w)}$$

mit $D_{vw} = p_{vw} - p_v p_w$, wobei p_{vw} die Frequenz des gemeinsamen Auftretens von +1 (Abbildung 5 B) an den Zielregionen v und w , p_v die Frequenz des Auftretens von +1 an der Zielregion v und p_w die Frequenz des Auftretens von +1 an der Zielregion w darstellt:

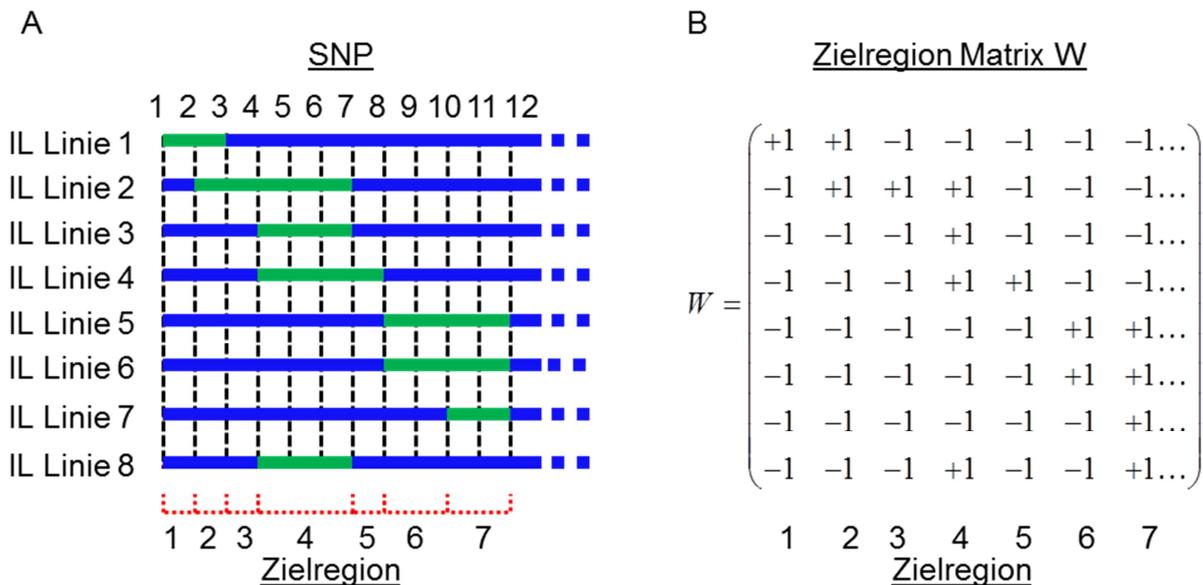


Abbildung 5 **A** Schematische Darstellung der Identifikation von Zielregionen und **B** Erstellung der Design Matrix W der Zielregionen für die Detektion von signifikanten Genomregion-Phänotyp Assoziationen (abgeändert nach Falke & Frisch (2011)).

2.2.3.2. Simulationsstudie

Die komplexe genetische Struktur der IL mit mehreren Donorgenomfragmenten je IL Linie erschwert die Identifikation von Genomregionen, die mit genotypischer Variation assoziiert sind. Um dennoch einzelne Genomregionen mit signifikantem Einfluss auf phänotypische Merkmale identifizieren zu können, wurden verschiedene statistische Methoden in einer Simulationsanalyse auf ihre Eignung, die genotypische Variation einzelnen Genomregionen zuzuordnen, getestet.

Hierzu wurden, basierend auf der tatsächlichen genetischen Struktur der IL (89 IL Linien, 1.861 SNP), zehn unabhängige QTL simuliert. Die 177 in den 89 IL Linien identifizierten Zielregionen wurden in einer $n \times p$ Zielregion Matrix \mathbf{W} , wie unter 2.2.3.1 beschrieben, zusammengefasst. Dabei stellt n die Anzahl der 89 IL Linien plus IL-RE ($n = 90$) und p die Anzahl der Zielregionen ($p = 177$) dar. Anschließend wurden zufällig zehn Zielregionen ($p_o = 10$) zu QTL erklärt. Diesen zehn QTL wurden zufällige Effekte aus einer trunkierten Normalverteilung mit $X \sim TN_{-3,3}(4, 100)$ zugeordnet. Die trunkierte Normalverteilung konnte dabei keine Werte zwischen -3 und 3 annehmen und resultierte in durchschnittlichen Effekten, deren Dimension der von experimentellen Daten entsprach. Den verbleibenden 167 Zielregionen ($p - p_o$) wurde kein Effekt zugeordnet, sodass der Vektor der QTL Effekte durch $\boldsymbol{\beta}_0 = (\beta_{0_1}, \dots, \beta_{0_{p_o}}, 0, \dots, 0)'$ repräsentiert werden kann. Die genotypischen Werte der IL Linien und von IL-RE wurden durch $\mathbf{g} = \mathbf{W}\boldsymbol{\beta}_0$ berechnet. Die phänotypischen Werte der IL Linien und von IL-RE wurden durch $\mathbf{y} = \mathbf{g} + \mathbf{e}$ mit $\mathbf{e} \sim N(0, \sigma^2\mathbf{I})$ und $\sigma^2 = \text{Var}(\mathbf{g}) \times (1 - h^2)$ h^2 simuliert. Für h^2 wurden fünf unterschiedliche Heritabilitäten ($h^2 = 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 0,9$) angenommen.

Ausgehend von den simulierten phänotypischen Werten der IL Linien wurden fünf statistische Verfahren auf ihre Eignung zur Detektion der genomischen Lokalisation der zuvor simulierten QTL erprobt.

- (I) Bei der Einzelmarkerregression (SMR) wird der phänotypische Wert der Linien i ($i = 1, \dots, 90$) durch das lineare Modell

$$Y_i = \hat{b}_0 + b_m x_{im} + e_i$$

dargestellt. \hat{b}_0 ist das Gesamtmittel, b_m ($m = 1, \dots, p$) ist der Regressionskoeffizient der m ten Zielregion und x_{im} ist die Indikatorvariable der m ten Zielregion in der i ten IL Linie. Die Versuchsfehler e_i werden als

unabhängig und identisch normalverteilt angenommen: $e_i \sim N(0, \sigma^2)$. Assoziationen einer Zielregion mit der phänotypischen Ausprägung wurden bei einem Signifikanzniveau von $\alpha_1 = 0,05$ als signifikant erklärt.

- (II) Die statistische Methode (II) entspricht der SMR aus Verfahren (I), allerdings wurde, um multiples Testen zu berücksichtigen, ein Bonferroni korrigiertes Signifikanzniveau $\alpha_2 = \alpha_1 / 177 = 0,05 / 177 = 0.0003$ verwendet (SMR_BK). Demnach wurde der Effekt einer Zielregion bei einem P-Wert kleiner als 0,0003 als signifikant erklärt.
- (III) In Verfahren (III) wurde eine bidirektionale schrittweise lineare Regression getestet (SR_AIC). Der phänotypische Wert der Linie i wird durch das lineare Modell

$$Y_i = \ddot{b}_0 + \sum_{l=1}^t b_l x_{il} + e_i$$

repräsentiert. \ddot{b}_0 ist das Gesamtmittel, b_l ($l = 1, \dots, t$; $t < p$) ist der partielle Regressionskoeffizient der l ten Zielregion und x_{il} ist die Indikatorvariable der l ten Zielregion in der i ten IL Linie, wobei $x_{il} \in [x_{im}, \dots, x_{ip}]$ gilt. Der zufällige Versuchsfehler wird durch $e_i \sim N(0, \sigma^2)$ repräsentiert. Das *stepAIC* Verfahren, implementiert im R Paket MASS (Venables & Ripley, 2002), wurde zur Durchführung der schrittweisen Regression verwendet. Die Modellselektion erfolgte auf Basis des Akaike Informationskriteriums (AIC, Akaike, 1974), definiert als

$$AIC = n \ln(\hat{\sigma}^2) + 2(t + 1)$$

wobei n die Anzahl an phänotypischen Beobachtungen ($n = 90$), t die Anzahl der Zielregionen im Modell und $\hat{\sigma}^2$ die Summe der Residuenquadrate geteilt durch n darstellt. In jedem Schritt während der schrittweisen Regression waren die folgenden Aktionen möglich: (i) füge dem Modell eine Zielregion hinzu (ii) entferne eine Zielregion aus dem Modell, (iii) keine Aktion. Im Fall (iii) war der minimale AIC erreicht und somit das finale Modell selektiert.

- (IV) In Verfahren (IV) wurde wie in Verfahren (III) eine bidirektionale schrittweise Regression getestet (SR_BIC), jedoch erfolgte die Modellselektion mittels des Bayes'schen Informationskriteriums (BIC, Schwarz, 1978), definiert durch

$$\text{BIC} = n \ln(\hat{\sigma}^2) + \ln(n) (t + 1)$$

wobei n die Anzahl an phänotypischen Beobachtungen, t die Anzahl der Zielregionen im Modell und $\hat{\sigma}^2$ die Summe der Residuenquadrate geteilt durch n darstellt. Das finale Modell wurde durch den minimalen BIC selektiert.

- (V) In Verfahren (V) wurde *ridge regression best linear unbiased prediction*, implementiert im R Paket *synbreed* (Wimmer et al., 2012) in Kombination mit einer Permutation basierten Variablenselektion (*thresholded ridge regression best linear unbiased estimator*, TRR_BLUP, Shao & Deng, 2012), für die Lokalisation der zuvor simulierten QTL getestet. Dabei wird der phänotypische Wert jeder Linie i durch

$$Y_i = \ddot{b}_0 + \sum_{w=1}^v b_w x_{iw} + e_i$$

beschrieben, wobei \ddot{b}_0 das Gesamtmittel, b_w ($w = 1, \dots, p$) den partiellen Regressionskoeffizienten der w ten Zielregion und x_{iw} die Indikatorvariable der w ten Zielregion in der i ten IL Linie darstellt. Der zufällige Versuchsfehler wird durch e_i repräsentiert $e_i \sim N(0, \sigma^2)$. Des Weiteren wurde angenommen, dass $b_w \sim N(0, \sigma_b^2)$ wodurch die geschätzten Effekte relativ zum Verhältnis der Residuen-Varianz (σ^2) zur Marker-Varianz (σ_b^2) gegen Null geschrumpft werden (Hoerl & Kennard, 1970). Sowohl σ^2 als auch σ_b^2 wurden mittels REML, implementiert in dem R Paket *lme4* (Bates & Maechler, 2012), ermittelt. Für die Variablenselektion wurde anschließend in Anlehnung an Churchill & Doerge (1994) y_i permutiert und für jedes b_w das 2,5 % ($Q_{b_w,0,025}$) und 97,5 % Quantil ($Q_{b_w,0,975}$) ermittelt. Wenn $Q_{b_w,0,025} \leq b_m \leq Q_{b_w,0,975}$ wurden diese Schätzwerte von b_w auf null gesetzt und als nicht mit einem simulierten QTL assoziiert betrachtet.

Jede Kombination aus simulierter Heritabilität und statistischem Verfahren wurde in 1.000 Wiederholungen getestet, um Stichproben-bedingte Effekte zu reduzieren und Ergebnisse mit hoher numerischer Präzision zu erhalten. Als Vergleichsgrößen

wurden jeweils die Sensitivität (S_n) und die Spezifität (S_p) der verschiedenen statistischen Verfahren bei unterschiedlichen Heritabilitäten, definiert als

$$S_n = \frac{TP}{(TP + FN)}$$

$$S_p = \frac{TN}{(TN + FP)}$$

ermittelt. Dabei steht TP für den Anteil der richtig positiv identifizierten QTL (*true positives*, der zuvor simulierte QTL wurde richtig erkannt), FN für den Anteil der falsch negativ identifizierten QTL (*false negatives*, der zuvor simulierte QTL wurde nicht erkannt), TN für den Anteil der richtig negativ identifizierten QTL (*true negatives*, ein nicht simulierter QTL wurde auch nicht identifiziert) und FP für den Anteil der falsch positiv identifizierten QTL (ein nicht simulierter QTL wurde fälschlich identifiziert). Zudem wurde für alle Kombinationen aus statistischen Verfahren und Heritabilität die Fähigkeit, die jeweils drei (aus insgesamt zehn) simulierten QTL mit größtem Effekt (QTL^M) zu detektieren, überprüft. Ein geschätzter Effekt wurde als TP gewertet, wenn genau auf der identifizierten Zielregion ein simulierter QTL lokalisiert war (Szenario 1). Die genotypische Auswertung der IL ergab ein ausgeprägtes LD, vor allem zwischen benachbarten Zielregionen. Um den Einfluss des LD auf die Detektion der simulierten QTL durch die verschiedenen statistischen Verfahren zu quantifizieren, wurde in einem weiteren Szenario (Szenario 2) die Sensitivität und Spezifität erneut berechnet. Dabei wurde ein in einem der statistischen Verfahren geschätzter Effekt als TP angenommen, wenn dieser Effekt auf derselben Zielregion oder auf einer der beiden benachbarten Zielregionen wie der zuvor simulierte QTL lokalisiert war.

2.2.3.3. Identifikation von Zielregionen mit Assoziation zu phänotypischen Merkmalen

Die Identifikation von signifikanten Assoziationen zwischen phänotypischen Merkmalen und Donorgenom-Zielregionen erfolgte entsprechend der in der Simulationsanalyse getesteten Methode SR_BIC. Wang et al. (2006) folgend, fand der Donor-Elter IL-DE in der Detektion von Zielregionen mit signifikantem Effekt keine Berücksichtigung. Die Zielregionen wurden in einer bidirektionalen,

schrittweisen, multiplen Regression als Prädiktorvariablen eingesetzt mit dem Ziel, jene Zielregionen zu identifizieren, welche einen oder mehrere QTL beinhalten. Der adjustierte Mittelwert (Y_i) der Inzuchtlinie i ($i = 1, \dots, 78$ im Feld und GWH11 bzw. $1, \dots, 34$ im GWH12) wird durch das lineare Modell

$$Y_i = \ddot{b}_0 + \sum_{l=1}^t b_l x_{il} + e_i$$

repräsentiert. Dabei stellt \ddot{b}_0 das Gesamtmittel, b_l ($l = 1, \dots, t$, $t = 164$ im Feld und GWH11 bzw. $t = 92$ im GWH12) den partiellen Regressionskoeffizienten der l ten Zielregion und x_{il} die Indikatorvariable der l ten Zielregion in der i ten Inzuchtlinie, kodiert als -1 und 1 für das Allel von IL-RE und IL-DE, dar. Der zufällige Versuchsfehler wird durch e_i ($e_i \sim N(0, \sigma^2)$) repräsentiert. Die durch das finale Modell erklärte phänotypische Varianz wurde durch das adjustierte Bestimmtheitsmaß (R_{adj}^2), das die Anzahl an Prädiktoren im finalen Modell berücksichtigt, geschätzt. Die von jeder einzelnen im finalen Modell befindlichen Zielregion erklärte phänotypische Varianz (R_l^2) wurde nach Zhu et al. (2004) berechnet.

2.2.3.4. Graphische Darstellung der Ergebnisse

Die Visualisierung und graphische Darstellung der Ergebnisse hinsichtlich der Feld-, Gewächshaus- und Klimakammerversuche, der hochdichten Genotypisierung der IL sowie der Simulationsanalyse erfolgte in R (R Development Core Team, 2012) unter Einbindung der R Pakete *lattice* (Deepayan, 2008), *RColorBrewer* (Neuwirth, 2011) und *synbreed* (Wimmer et al., 2012).

3. Ergebnisse

Die aus der Kreuzung IL-RE mit IL-DE entwickelte IL, bestehend aus 89 IL Linien, wurde hochauflösend genotypisiert und sowohl im Feld als auch im Gewächshaus hinsichtlich $\Delta^{13}\text{C}$ sowie für Merkmale der Pflanzenentwicklung und Pflanzenphysiologie phänotypisiert. Die diesbezüglichen Ergebnisse werden im Folgenden dargestellt.

3.1. Genotypisierung der Introgressionsbibliothek mit SSR Markern

Die Genotypisierung der IL mit 226 SSR Markern lässt eine nahezu ideale IL mit einer Donorgenomabdeckung von über 82 % und nur vereinzelt mehr als einem Donorgenomfragment je IL Linie vermuten.

Die Ergebnisse der IL Charakterisierung an Hand der zur Entwicklung der IL Linien verwendeten 226 SSR Marker ist in Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3 Übersicht über die Genotypisierung der IL mit 226 SSR Markern

Chr.	Anzahl SSR	gen. Länge [cM]	Donorgenom -abdeckung [%]	Abstand zwischen SSR		
				Mittel [cM]	Min. [cM]	Max. [cM]
1	26	285,1	88,3	11,4	0,0	65,1
2	26	207,3	66,4	8,9	0,1	51,3
3	33	187,8	100,0	5,9	0,1	33,9
4	22	177,7	54,0	10,0	0,0	25,6
5	25	175,0	100,0	7,3	0,0	21,8
6	23	171,0	79,8	8,1	0,0	29,7
7	15	168,7	83,5	11,8	3,2	33,3
8	17	142,1	100,0	8,9	0,0	30,2
9	17	153,6	86,6	9,6	0,4	56,2
10	22	119,4	56,6	5,7	0,9	23,7
Σ/\emptyset	226	1.787,7	82,1	8,8	0,0	65,1

Chr.; Chromosom, gen. Länge; genetische Länge, cM; centi Morgan, Σ ; Summe der Anzahl SSR und gen. Länge, \emptyset ; gewichtetes Mittel der Donorgenomabdeckung

Die 226 SSR Marker waren nicht gleichmäßig über alle zehn Chromosomen verteilt. Die meisten Marker waren auf Chromosom 3, die geringste Anzahl an Markern auf Chromosom 7 lokalisiert. Die genetischen Abstände entstammen einer KWS-internen genetischen Karte. Die einzelnen Chromosomenlängen (jeweils ermittelt durch die Position des letzten SSR Markers) entsprechen den Chromosomenlängen publizierter genetischer Karten (Ganal et al., 2011). Somit kann davon ausgegangen werden, dass das Maisgenom nahezu vollständig mit SSR Markern abgedeckt wurde. Im mit SSR Markern abgedeckten Genombereich konnten insgesamt 82,1 % des Donorgenoms im genomischen Hintergrund des rekurrenten Elters dargestellt werden. Auf den Chromosomen 3, 5 und 8 zeigte für alle SSR Markerloci jeweils mindestens eine IL Linie das Allel des Donors IL-DE, sodass auf diesen Chromosomen 100 % des Donorgenoms wiedergefunden werden konnte. Die geringste Donorgenomabdeckung wurde auf den Chromosomen 4 (54,0 %) und 10 (56,5 %) detektiert. So fehlten insbesondere Donorgenomregionen an den distalen Regionen auf Chromosom 4 im Bereich von 0,00 bis 43,53 cM und auf Chromosom 10 in den Bereichen 0,00 – 36,05 cM bzw. 107,68 – 119,43 cM. Über alle Chromosomen und IL Linien betrachtet waren 286,8 cM des Donorgenoms heterozygot. Alle SSR Markerloci, die in einer IL Linie ein heterozygotes Allel zeigten, zeigten jedoch in mindestens einer weiteren IL Linie ein homozygotes Allel von IL-DE. Die einzige Ausnahme stellt ein SSR Markerlocus auf Chromosom 7 dar. Dieser zeigte ein heterozygotes Allel in der IL Linie IL-73. Keine weitere IL Linie zeigte ein homozygotes Donorallel an diesem Locus, sodass 7,52 cM der geschätzten Donorgenomabdeckung ausschliesslich in heterozygoter Form vorlagen. Bedingt durch die überdurchschnittliche Anzahl an SSR Markern auf Chromosom 3, wurde dort auch der geringste durchschnittliche Abstand zwischen benachbarten Markern erreicht. Die größten durchschnittlichen Abstände zwischen benachbarten Markern wurden auf Chromosom 7 festgestellt. Über alle Chromosomen betrachtet, betrug der mittlere Abstand zwischen benachbarten SSR Marker Loci 8,8 cM, wobei der größte Abstand zwischen zwei Markern (65,1 cM) am Anfang von Chromosom 1 lag. Die Genotypisierung mit 226 SSR Markern ergab, dass 58 IL Linien (65,2 %) wie beabsichtigt ein einzelnes Donorgenomfragment im ansonsten homogenen genetischen Hintergrund des rekurrenten Elters IL-RE aufwiesen. 19 IL Linien (21,34 %) wiesen zwei und zwölf IL Linien (13,47 %) mehr als zwei Donorgenomfragmente auf. Im Durchschnitt über alle Chromosomen und Linien

wurden 1,55 Donorgenomfragmente je IL Linie detektiert. Die IL Linien IL-56 und IL-73 zeigten fünf Donorgenomfragmente je Linie und somit die maximale Anzahl an Fragmenten aller IL Linien. IL-56 hatte drei homozygote Fragmente auf Chromosom 6 mit 0,95 cM, 15,48 cM, 21,75 cM Länge und zwei Fragmente auf Chromosom 9 (40,28 und 33,16 cM Länge). Die IL Linie IL-73 wies zwei homozygote Fragmente jeweils auf Chromosom 8 (51,12 cM) und Chromosom 10 (7,55 cM) auf. Zudem wurde ein komplett heterozygoten Fragment auf Chromosom 6 (17,71 cM) detektiert und zwei weitere waren auf Chromosom 7 (5,58 cM und 22,60 cM) lokalisiert. Die durchschnittliche Länge der Donorgenomintrogression je IL Linie variierte zwischen 3,99 cM (0,22 % der Genomlänge) in IL-30 und 172,24 cM (9,64 %) in IL-42 und betrug im Mittel über alle Linien 50,08 cM (2,80 %).

3.2. Genotypisierung der Introgressionsbibliothek mit SNP Markern

3.2.1. SNP Verteilung und Qualitätskontrolle im genetischen Material der Introgressionsbibliothek

Die Ergebnisse der Genotypisierung mit dem MaizeSNP50 BeadChip sind reproduzierbar. Sowohl die Verteilung aller SNP, aber auch die der zwischen IL-RE und IL-DE polymorphen SNP über das Genom ist nicht einheitlich.

Vor der genetischen Charakterisierung der gesamten IL wurde die Verlässlichkeit des MaizeSNP50 BeadChip im genetischen Material IL-RE x IL-DE getestet. Hierfür wurden sieben biologische Replikate von IL-RE bzw. vier biologische Replikate von IL-DE mit dem MaizeSNP50 BeadChip analysiert. Es wurde getestet, ob in allen Replikaten von IL-RE bzw. in allen Replikaten von IL-DE an jeweils demselben SNP Locus ein konsistentes Allel angezeigt wird. Der Anteil an SNP, der über die getesteten Replikate von IL-RE bzw. IL-DE keine konsistenten Allele ergab, ist in Tabelle 4 zusammengefasst.

Der Großteil (31.177 SNP) der 32.194 ausgewerteten SNP zeigte über die sieben biologischen Replikate des rekurrenten Elters IL-RE an den einzelnen SNP Loci jeweils identische Allele. Von den insgesamt 1.017 SNP, die an den jeweiligen SNP Loci keine identischen Allele über die sieben Proben von IL-RE ergaben, zeigten 726

SNP sowohl heterozygote als auch homozygote Allele. Diese 726 SNP Loci waren hauptsächlich in einzelnen zusammenhängenden Clustern auf den Chromosomen 1, 3 und 9 lokalisiert und überspannten jeweils 7,23 Mb, 5,18 Mb bzw. 23,97 Mb.

248 SNP konnten in jeweils ein bis drei der sieben Replikate von IL-RE technisch nicht ausgewertet werden (no call). Für 43 SNP ergaben sich für drei der sieben Replikate von IL-RE zwei gegensätzliche homozygote Allele am selben SNP Locus. Von diesen 43 SNP war ein SNP auf Chromosom 4 und 42 SNP auf Chromosom 2 lokalisiert. Die 42 SNP auf Chromosom 2 befanden sich in drei unterbrochenen Clustern mit einer Gesamtlänge von 0,43 Mb. Alle 32.194 SNP konnten in mindestens einem IL-RE Replikat technisch ausgewertet werden, wobei sich an 88 SNP Loci konsistent über alle sieben IL-RE Replikate ein heterozygotes Allel ergab.

Der Anteil an SNP, der in den vier biologischen Replikaten von IL-DE jeweils ein einheitliches Allel ergab, lag bei 99,38 % (31.993 SNP) und somit deutlich höher als bei IL-RE. Dies änderte sich auch nicht unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Stichprobengröße, überprüft durch wiederholtes zufälliges Ziehen von vier aus sieben Replikaten von IL-RE. Die Mehrzahl der SNP, die an einem SNP Locus über die vier Replikate kein konsistentes Allel zeigten, gehörten zur Gruppe derer, die in einer, zwei oder drei der vier IL-DE Replikate technisch nicht ausgewertet werden konnten (195 SNP). Keiner der 32.194 SNP zeigte über die vier IL-DE Einzelpflanzen zwei unterschiedliche homozygote Allele am selben SNP Locus und nur 6 SNP zeigten am gleichen Locus sowohl ein homozygotes als auch ein heterozygotes Allel. Es wurden 356 SNP detektiert, die in keiner der vier IL-DE Replikate technisch ausgewertet werden konnten (no call). Die Verteilung dieser in keinem Replikat auszuwertenden SNP ergab eine einheitliche Verteilung im Genom. Mit Ausnahme einer Region auf Chromosom 6 (von 63,92 bis 64,09 Mb) wurden keine Cluster mit mehr als 2 SNP in Folge detektiert, die über alle IL-DE Proben technisch nicht auszuwerten waren. Insgesamt ergaben 23 SNP ein einheitlich heterozygotes Allel in allen Einzelpflanzen von IL-DE.

Die Aussagekraft des MaizeSNP50 BeadChip in Bezug auf das aus der Kreuzung IL-RE x IL-DE hervorgegangene genetische Material wurde an Hand der SNP Verteilung über die Mais Chromosomen analysiert (Abbildung 6). Die 32.194 SNP waren aufgrund einer signifikanten Häufung von SNP auf Chromosom 1 (5.423 SNP) signifikant ungleich verteilt. Die SNP Verteilung war auch innerhalb der 10 Mais Chromosomen, die jeweils in 10 Mb große Bins unterteilt wurden, nicht einheitlich.

Unabhängige paarweise Chi-Quadrat Tests, korrigiert nach Benjamini- Hochberg (FDR < 5 %), ermöglichten die Identifikation von Bins mit signifikant höherer bzw. niedrigerer Anzahl an Gesamt-SNP (Abbildung 6).

Tabelle 4 Qualität und Reproduzierbarkeit der Genotypisierung mit 32.194* SNP Marker des MaizeSNP50 BeadChip

	Chromosom										gesamt
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
<u>IL-RE (7)</u>											
kein konsistentes Allel am SNP Locus [%]	4,04	4,31	4,57	2,35	3,49	2,16	2,05	0,28	6,19	0,09	3,16
inkonsistent auswertbar - nicht auswertbar [%]	0,42	0,28	0,28	0,29	1,43	1,56	2,05	0,20	1,67	0,09	0,77
inkonsistent homozygote und heterozygote Allele [%]	3,61	2,84	4,29	2,03	2,07	0,61	0,00	0,08	4,52	0,00	2,26
inkonsistent homozygote Allele [%]	0,00	1,18	0,00	0,03	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,13
konsistent nicht auswertbar [%]	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
konsistent heterozygote Allele [%]	0,15	0,37	0,06	0,14	0,48	0,95	0,22	0,08	0,16	0,26	0,27
<u>IL-DE (4)</u>											
kein konsistentes Allel am SNP Locus [%]	0,53	0,70	0,53	0,86	0,50	0,49	0,74	0,61	0,49	0,88	0,62
inkonsistent auswertbar - nicht auswertbar [%]	0,52	0,70	0,53	0,80	0,48	0,46	0,71	0,61	0,49	0,88	0,61
inkonsistent homozygote und heterozygote Allele [%]	0,02	0,00	0,00	0,06	0,03	0,04	0,04	0,00	0,00	0,00	0,02
inkonsistent homozygote Allele [%]	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
konsistent nicht auswertbar [%]	1,36	0,68	1,16	1,55	1,34	1,48	0,63	0,44	1,10	0,88	1,11
konsistent heterozygote Allele [%]	0,04	0,03	0,08	0,14	0,06	0,11	0,11	0,08	0,04	0,04	0,07

* Die 32.194 SNP Marker verblieben nachdem von den 56.110 SNP Marker auf dem MaizeSNP50 BeadChip solche mit technisch bedingter niedriger Qualität bzw. statistischer Sicherheit entfernt wurden.

Von den insgesamt 200 Bins beinhalteten 36 (18 %) signifikant mehr und 38 (19 %) signifikant weniger SNP als unter der Nullhypothese erwartet. Dabei waren die Bins mit signifikant mehr SNP vorrangig an den distalen (Telomer nahen) und die Bins mit signifikant weniger SNP an proximalen (Zentromer nahen) Chromosomenabschnitten lokalisiert. So zeigten von den 20 äußersten Bins (je zwei pro Chromosom) 14 eine signifikant höhere Anzahl an SNP. Von den 10 Bins, welche die Zentromerregion beinhalteten, zeigten sieben signifikant weniger SNP und von den verbleibenden drei Bins auf Chromosom 3, 9 und 10 zeigte mindestens eines der Zentromer flankierenden Bins signifikant weniger SNP.

Zwischen den beiden Eltern IL-RE und IL-DE waren 11.505 (35,77 %) der SNP polymorph. Davon waren signifikant weniger polymorphe SNP als erwartet auf den Chromosomen 2 (32,73 % polymorphe SNP) und 3 (32,96 %) und signifikant mehr auf den Chromosomen 4 (38,56 %), 8 (39,20 %) und 10 (40,31 %) lokalisiert.

Die Anzahl an SNP je Bin und die Anzahl der zwischen IL-RE und IL-DE polymorphen SNP je Bin zeigten eine signifikante Korrelation ($r = 0,81$). Der Anteil an polymorphen SNP zeigte daher, wie auch der Anteil aller SNP, eine ungleichmäßige Verteilung innerhalb der einzelnen Chromosomen. Diese fiel, verglichen mit der ungleichen Verteilung aller SNP, jedoch deutlich geringer aus. So zeigten 15 von 200 Bins einen signifikant höheren und 16 einen signifikant geringeren Anteil an polymorphen SNP. Von den 15 Bins mit signifikant höherem Anteil polymorpher SNP beinhalteten vier das in B73 Refseq v2 annotierte Zentromer (Chromosomen 5, 7, 8, 10). Drei dieser vier Bins wiesen gleichzeitig eine geringere Anzahl an SNP auf, sodass in diesen Genomregionen von einem erhöhten Polymorphiegrad zwischen IL-RE und IL-DE ausgegangen werden kann. Die das Zentromer beinhaltenden Regionen der Chromosomen 1, 2 und 4 ergaben hingegen jeweils, wie erwartet, einen signifikant geringeren Anteil polymorpher SNP.

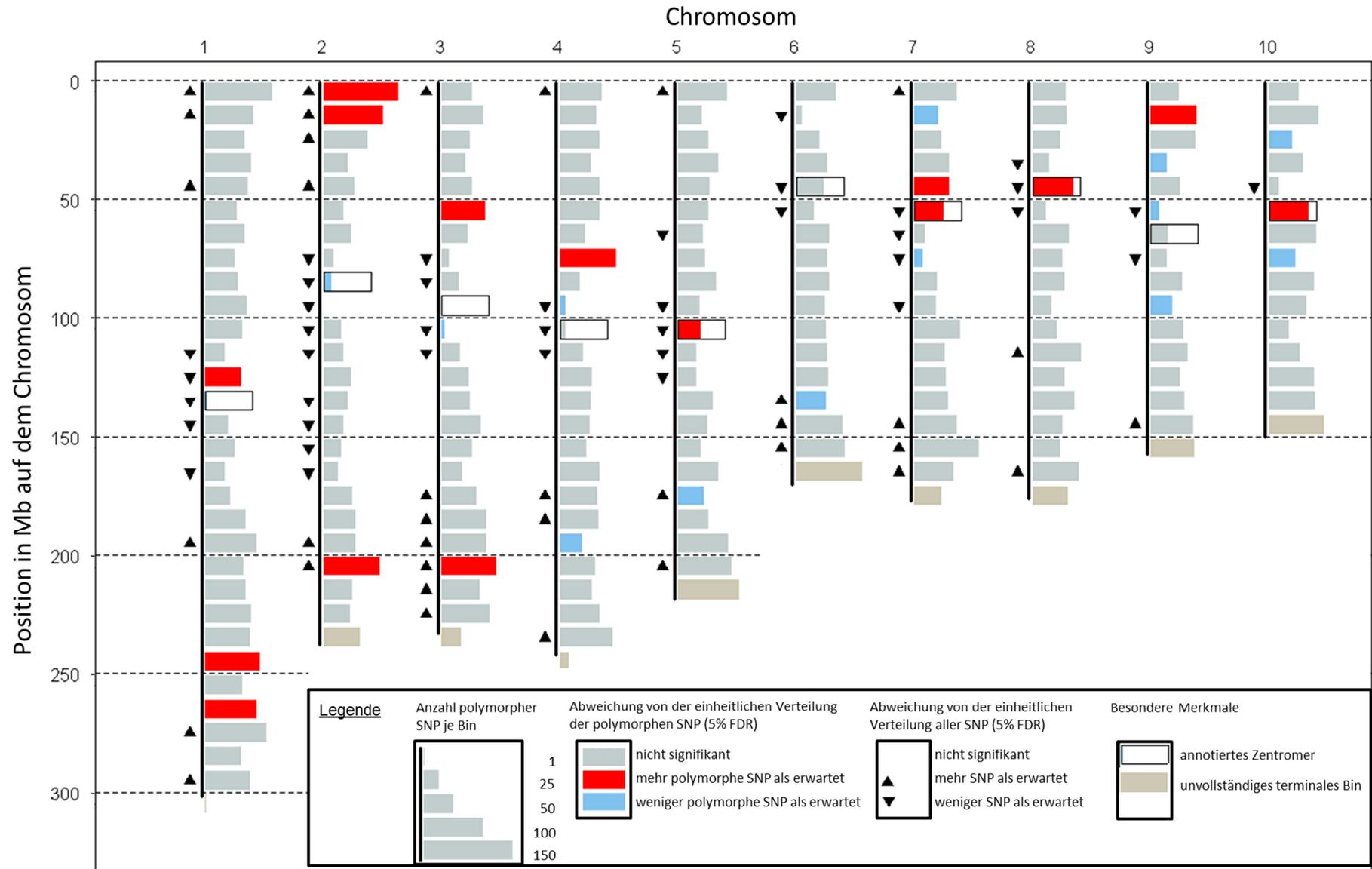


Abbildung 6 Verteilung von 32.194 SNP Marker des MaizeSNP50 BeadChip über die 10 Mais Chromosomen

3.2.2. Genetische Charakterisierung der Introgressionsbibliothek mit 1.861 SNP

Die Genomstruktur der IL ermöglicht eine Fokussierung auf 1.861 SNP Marker mit höchster Qualität ohne Informationsverlust für die Genotypisierung. Die hochauflösende Genotypisierung mit diesen 1.861 SNP ergab eine Donorgenomabdeckung von 90 % und im Durchschnitt über alle IL Linien mehr als zwei Donorgenomfragmente je Linie.

Für die genetische Charakterisierung der 89 IL Linien und die Identifikation von Donorgenom-Zielregionen wurden 1.861 SNP Marker stringent selektiert. Die stringenter SNP Selektion, verglichen mit den 32.194 SNP, anhand derer die Aussagekraft des MaizeSNP50 BeadChip im genetischen Material IL-RE x IL-DE analysiert wurde, erfolgte aus zwei Gründen. Erstens ermöglichte die begrenzte Anzahl an Rekombinationsereignissen in der IL eine Reduktion der Markerdichte ohne Verlust an genetischer Information (Abbildung A 2). Zweitens konnten im Rahmen der Selektion auf 1.861 SNP ausschließlich jene Marker für die Charakterisierung der IL verwendet werden, welche die bestmöglichen Qualitätskriterien (call frequency = 1; GenTrain Score $\geq 0,9$) erfüllten und somit einen Datensatz höchster Qualität darstellen.

Basierend auf den 1.861 SNP überspannte der mit SNP abgedeckte Bereich 2.044,3 Mb des Maisgenoms (Tabelle 5). Somit wurden, verglichen mit der B73 Refseq_v2, 14,38 Mb nicht mit SNP abgedeckt. Der größte, nicht von SNP abgedeckte Bereich befand sich an den distalen Regionen von Chromosom 3. Die SNP auf Chromosom 3 überspannten 225,8 Mb, sodass ein Bereich von 6,34 Mb, verglichen mit der B73 Refseq_v2, fehlte. Dieser Bereich hätte vollständig mit den 32.194 SNP abgedeckt werden können, jedoch befand sich in dieser Region kein zwischen den IL Eltern polymorpher SNP mit einer call frequency $> 0,5$. Chromosom 2 konnte mit einer Länge von 237,0 Mb vollständig mit SNP abgedeckt werden. Auf den restlichen Chromosomen fehlten jeweils kleinere Regionen an den äußersten distalen Bereichen. Die über das gesamte Genom betrachtete Donorgenomabdeckung betrug 90,0 %. Das Genom von IL-DE im genetischen Hintergrund von IL-RE konnte auf den Chromosomen 2, 3 und 5 vollständig wiedergefunden werden. Die geringste Donorgenomabdeckung wurde auf Chromosom 6 detektiert. Hier sind über alle IL Linien nur 33,0 % des IL-DE Genoms repräsentiert. Die Selektion der 1.861 SNP erfolgte unter Berücksichtigung einer möglichst gleichmäßigen Markerverteilung

(Abbildung 7). Dies spiegelt sich auch in der geringen Variation der durchschnittlichen Markerabstände je Chromosom wider (von 0,8 Mb auf Chromosom 10 bis 1,4 Mb auf den Chromosomen 2 und 5). Über alle Chromosomen betrachtet, befand sich im Durchschnitt alle 1,1 Mb ein SNP. Dennoch wiesen die Extrema der Markerabstände je Chromosom große Variationen auf. Auf den Chromosomen 5, 7 und 8 betrug der minimale Abstand zwischen zwei SNP nur 1 bp. Hingegen betrug der kleinste Abstand zwischen zwei benachbarten SNP auf Chromosom 9 134 bp. Der größte Abstand zwischen benachbarten SNP zeigte sich auf Chromosom 7 (20,8 Mb). Mit Ausnahme der Chromosomen 5 und 10 wiesen jeweils die das Zentromer flankierenden SNP den größten Abstand zueinander auf.

Tabelle 5 Anzahl SNP, physikalische Länge, Donorgenomabdeckung und durchschnittlicher, kleinster und größter Abstand zweier benachbarter SNP Marker über alle IL Linien und Chromosomen basierend auf der Genotypisierung mit 1.861 SNP Markern.

Chr.	Anzahl SNP	phys. Länge [Mb]	Donorgenomabdeckung [%]	Abstand zwischen SNP		
				Mittel [Mb]	Min. [bp]	Max. [Mb]
1	348	299,5	98,8	0,9	36,0	13,0
2	167	237,0	100,0	1,4	12,0	16,2
3	185	225,8	100,0	1,2	29,0	18,0
4	214	240,8	72,8	1,1	6,0	8,5
5	161	217,7	100,0	1,4	1,0	9,3
6	171	168,7	33,0	1,0	61,0	10,6
7	162	176,1	99,6	1,1	1,0	20,8
8	133	174,3	96,2	1,3	1,0	11,4
9	123	155,5	94,8	1,3	134,0	10,4
10	197	148,9	95,5	0,8	4,0	5,5
Σ/ø	1.861	2.044,3	90,0	1,1	1,0	20,8

Chr.; Chromosom, phys. Länge; physikalische Länge, Mb; Megabasen, bp; Basenpaare, Σ; Summe der Anzahl SNP und phys. Länge, ø; gewichtetes Mittel der Donorgenomabdeckung

Obwohl die Selektion der IL Linien markergestützt unter anderem hinsichtlich kompletter Homozygotie erfolgte, wurden dennoch auf neun der zehn Chromosomen heterozygote Donorgenomfragmente detektiert. Insbesondere in den IL Linien IL-31

und IL-41 (Abbildung 8) fanden sich größere heterozygote Donorgenomfragmente auf den Chromosomen 4 und 5, sodass auf diesen beiden Chromosomen jeweils 135,1 Mb und 166,9 Mb in heterozygoter Form vorlagen. Auf den verbleibenden sieben Chromosomen zeigten sich nur kleinere heterozygote Fragmente mit einer Gesamtlänge von 113,0 Mb. Alle Markerloci, die in einer IL Linie ein heterozygotes Allel aufwiesen, zeigten jedoch mindestens in einer weiteren IL Linie das IL-DE Allel in homozygoter Form.

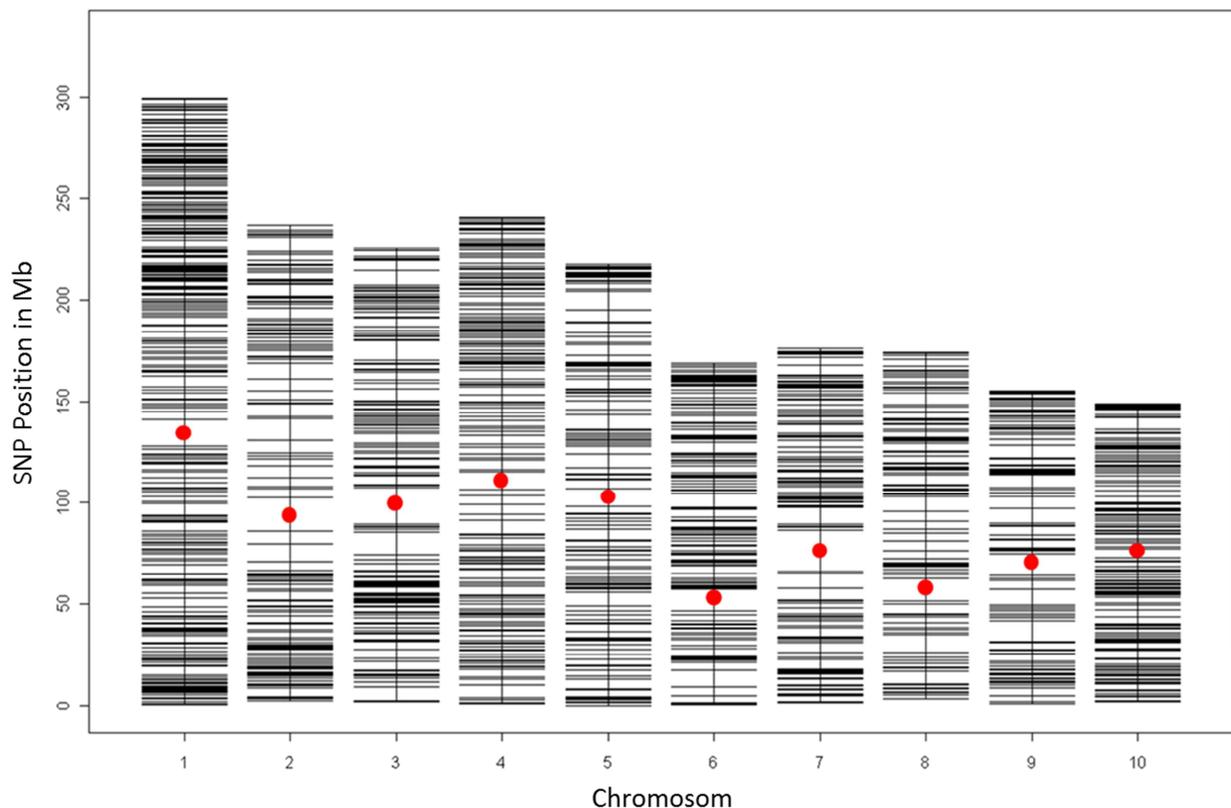


Abbildung 7 Verteilung der für die Charakterisierung der IL verwendeten 1.861 SNP über die 10 Mais Chromosomen. Die roten Punkte kennzeichnen die Position der in der B73 Referenzsequenz (B73 Refseq_v2) annotierten Zentromere.

Die Anzahl einzelner Donorgenomfragmente je IL Linie variierte zwischen einem und fünf Donorgenomfragmenten, wobei 40 IL Linien (44,9 %) ein einzelnes Donorgenomfragment und acht Linien (9 %) mehr als vier Fragmente je Linie trugen. Durchschnittlich trugen die IL Linien 2,2 Donorgenomintrogessionen. Ebenso wie die Anzahl an Fragmenten je IL Linie variierte auch die absolute Länge der Donorgenomintrogessionen zwischen 1,8 Mb (IL-50) und 327,4 Mb (IL-42), wobei im

Mittel über alle Linien die Länge der Introgressionen 86,3 Mb (4,2 % des gesamten Donorgenoms) betrug.

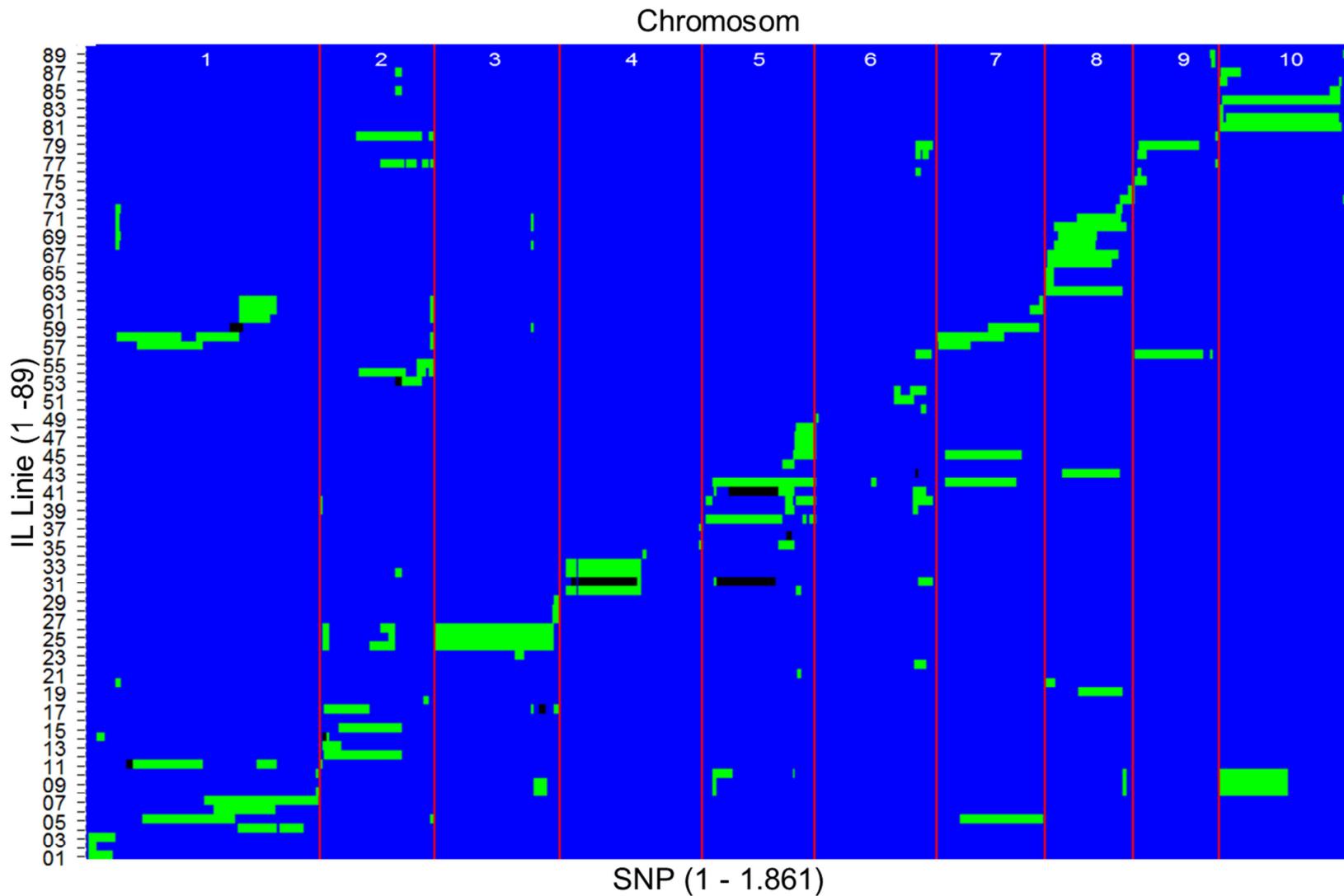


Abbildung 8 Überblick über die genetische Struktur der 89 IL Linien. Auf der x-Achse sind die SNP Marker (1, ..., 1861) entsprechend ihrer Genomposition und auf der y-Achse die IL Linien (01,..., 89) aufgetragen. Chromosomen sind durch rote Linien voneinander getrennt. Die SNP-Allele des Donor-Elters sind in grün, die des rekurrenten Elters sind in blau und heterozygote Allele sind in schwarz dargestellt.

3.2.3. Verteilung der Donorgenom-Zielregionen

Die Zerlegung der Donorgenomfragmente in definierte Zielregionen reduzierte das durchschnittliche LD in der IL erheblich, jedoch stehen direkt benachbarte Zielregionen noch weiter in hohem LD zueinander.

Durch die Zerlegung der einzelnen, häufig überlappenden Donorgenomfragmente konnten 177 Zielregionen in der IL (89 IL Linien) identifiziert werden. Das durchschnittliche LD von $r^2 = 0,28$ (basierend auf 1.861 SNP) wurde auf $r^2 = 0,03$ (basierend auf 177 Zielregionen) reduziert. Dennoch wurde auch weiterhin ein erhebliches LD, insbesondere bei direkt benachbarten Zielregionen festgestellt. Über alle Chromosomen gemittelt befanden sich direkt benachbarte Zielregionen in einem LD von $r^2 = 0,61$. Zusätzlich wurden r^2 -Werte $> 0,6$ zwischen den Chromosomen 1 und 7 bzw. 2 und 9 detektiert (Abbildung 9).

Das hohe LD zwischen Chromosom 1 und 7 begründete sich vor allem durch die Donorgenomfragmente der Linien IL-57 und IL-58. So zeigte sich, dass zwei Zielregionen, jeweils eine auf Chromosom 1 und eine auf 7, nur in der IL-Linie IL-58 auftraten. Diese Zielregionen standen folglich in einem vollständigem LD ($r^2 = 1,00$) zueinander. Eine weitere Zielregion auf Chromosom 1 trat nur in den Linien IL-11, IL-57 und IL-58 auf und stand in einem LD von 0,66 mit einer Zielregion auf Chromosom 7, die ausschließlich durch IL-57 und IL-58 repräsentiert wurde. Ebenso verhielt es sich bezüglich des hohen LDs zwischen Chromosom 2 und 9. Dabei war eine Zielregion auf Chromosom 2 in IL-53, IL-77 und IL-80 vertreten. IL-77 und IL-80 trugen als einzige Linien auch die Zielregion auf Chromosom 9, woraus ein LD von 0,66 resultierte. Wie aus Abbildung A 1 (im Anhang) ersichtlich, wurden IL-11 und IL-58 aus einer gemeinsamen BC₂ Pflanze, IL-53 und IL-77 und auch IL-57 und IL-58 bzw. IL-77 und IL-80 aus jeweils einer gemeinsamen BC₁ Pflanze entwickelt. Somit unterscheiden sich diese sechs Linien mindestens in zwei Rückkreuzungs- und drei Selbstungsschritten. Den sechs Linien gemeinsam ist jedoch ihre überdurchschnittlich hohe Donorgenomabdeckung je Linie. Im Vergleich zur durchschnittlichen Donorgenomabdeckung aller 89 IL Linien (86,3 Mb) deckten die sechs IL Linien (IL-11, IL-53, IL-57, IL-58, IL-77, IL-80) im Durchschnitt 161,8 Mb des Donorgenoms ab. Neben dem LD von 1 zwischen Zielregionen auf Chromosom 1 und 7 standen weitere 14 Zielregion-Kombinationen in einem vollständigen LD. Von diesen 14 Kombinationen traten zwei innerhalb von Chromosom 1, eine innerhalb

von Chromosom 2, drei innerhalb von Chromosom 3, eine innerhalb von Chromosom 4, sechs innerhalb von Chromosom 5 und eine innerhalb von Chromosom 7 auf.

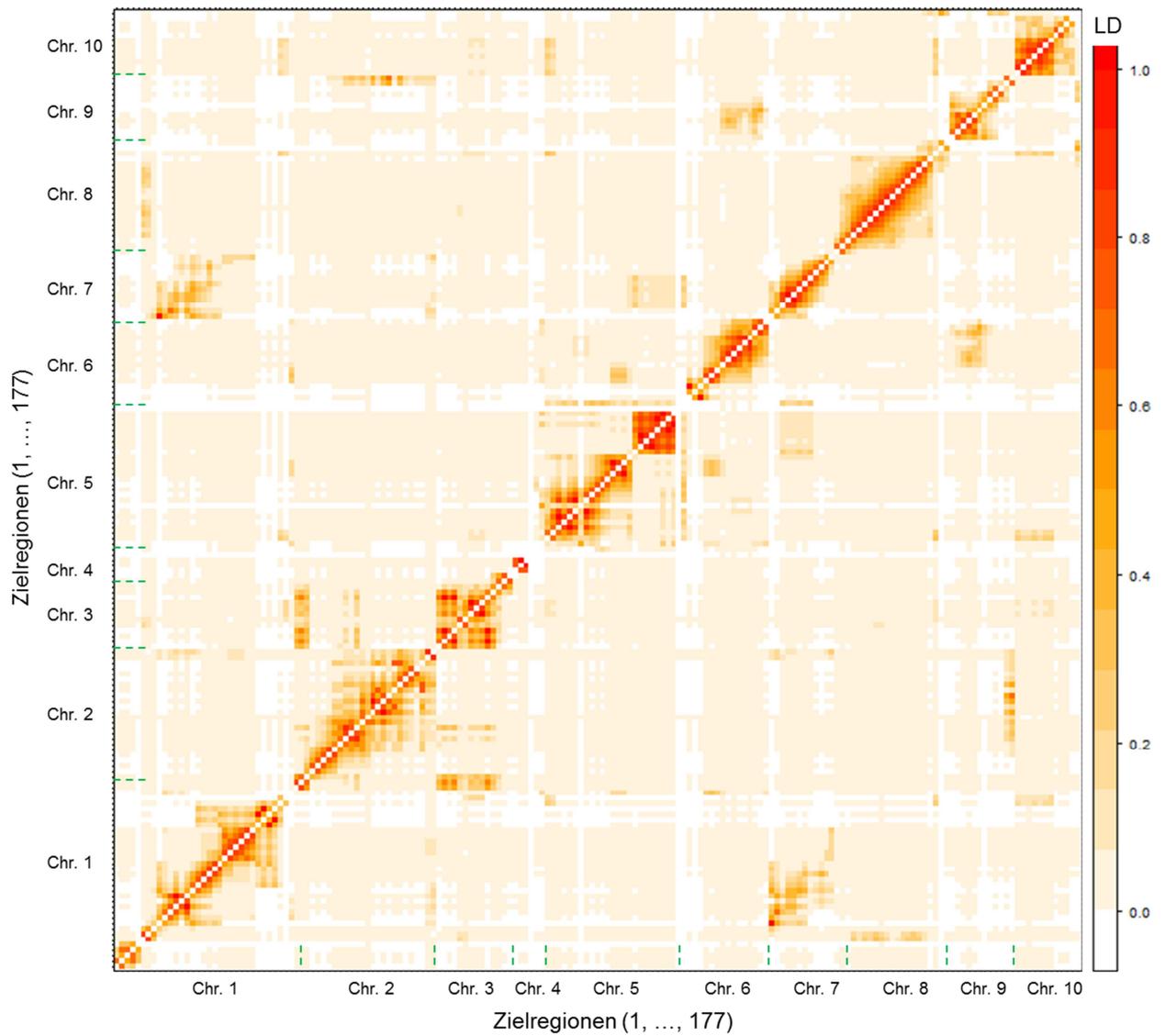


Abbildung 9 Paarweises Kopplungsphasenungleichgewicht zwischen 177 Zielregionen basierend auf 89 IL Linien

3.3. Vergleich statistischer Verfahren für die Detektion von signifikanten Phänotyp-Genotyp Assoziationen

Die getesteten Methoden zeigten eine deutliche Variation hinsichtlich Sensitivität und Spezifität. Unter Berücksichtigung des LD zwischen den Zielregionen, wurde für alle Methoden eine Verbesserung in der Sensitivität und Spezifität beobachtet und alle drei simulierten QTL mit größtem Effekt wurden detektiert.

Basierend auf der tatsächlichen genotypischen Struktur der IL (charakterisiert mit 1.861 SNP Markern) und den sich daraus ergebenden 177 Zielregionen, wurde eine Simulationsstudie durchgeführt. Dabei wurden jeweils zehn QTL mit zufällig aus einer truncierten Normalverteilung gezogenen Effekten zehn Zielregionen zugeordnet. Es wurde die Eignung von fünf verschiedenen statistischen Verfahren ermittelt, die zuvor simulierten QTL in der IL zu lokalisieren.

Sowohl in der Sensitivität als auch in der Spezifität zeigten sich deutliche Unterschiede bei allen simulierten Heritabilitäten zwischen den fünf getesteten Verfahren. Mit Zunahme der Heritabilität von $h^2 = 0,2$ auf $h^2 = 0,9$ zeigten alle fünf statistischen Verfahren ein Ansteigen der Sensitivität und Abfallen der Spezifität (Abbildung 10). Mit Ausnahme der Heritabilitätsstufe $0,2 \leq h^2 < 0,4$ ergab sich sowohl für die Sensitivität als auch für die Spezifität eine einheitliche Rangierung der Verfahren. SMR_BK, gefolgt von SR_BIC, stellte jeweils das Verfahren mit der geringsten Sensitivität und höchsten Spezifität und TRR_BLUP das mit der höchsten Sensitivität und geringsten Spezifität dar. Auffallend war die zunächst parallel ansteigende Sensitivität von SMR_BK und SR_BIC zwischen $h^2 = 0,2$ und $h^2 = 0,6$, gefolgt von einem deutlich stärkeren Ansteigen der Sensitivität von SR_BIC, verglichen mit SMR_BK in Folge einer erhöhten Heritabilität.

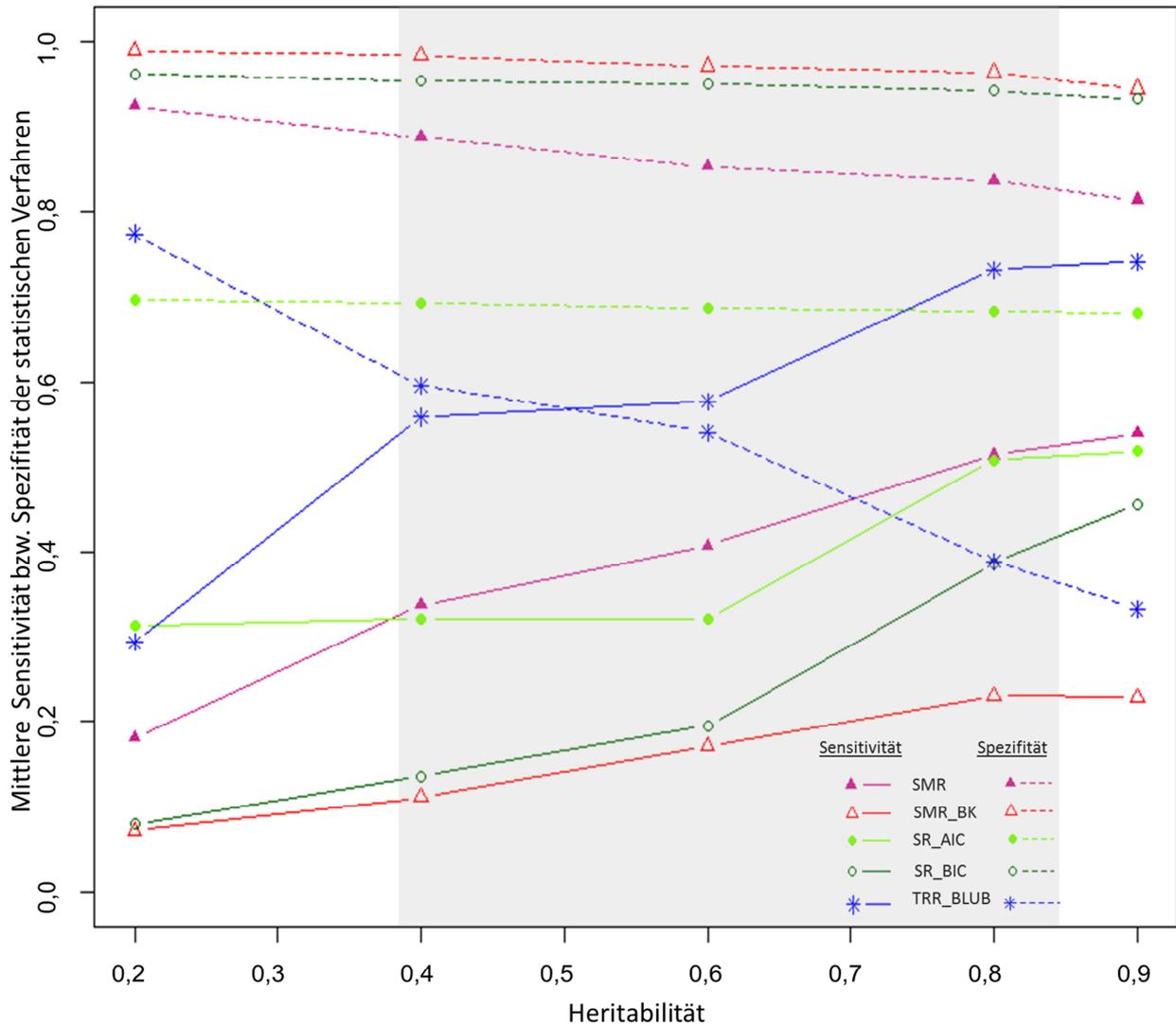


Abbildung 10 Sensitivität und Spezifität der statistischen Verfahren bezüglich der korrekten Lokalisation von simulierten QTL. Der Heritabilitätsbereich der experimentellen Daten dieser Arbeit ist als grauer Bereich dargestellt.

Gleichzeitig unterschieden sich in diesem Heritabilitätsbereich jedoch die Spezifitäten von SMR_BK und SR_BIC nur geringfügig. Im Vergleich dazu änderte sich die Rangierung der Verfahren bzgl. Sensitivität und Spezifität im unteren Heritabilitätsbereiches ($0,2 \leq h^2 < 0,4$). So zeigte SR_AIC bei $h^2 = 0,2$ die größte Sensitivität und geringste Spezifität aller getesteten Verfahren.

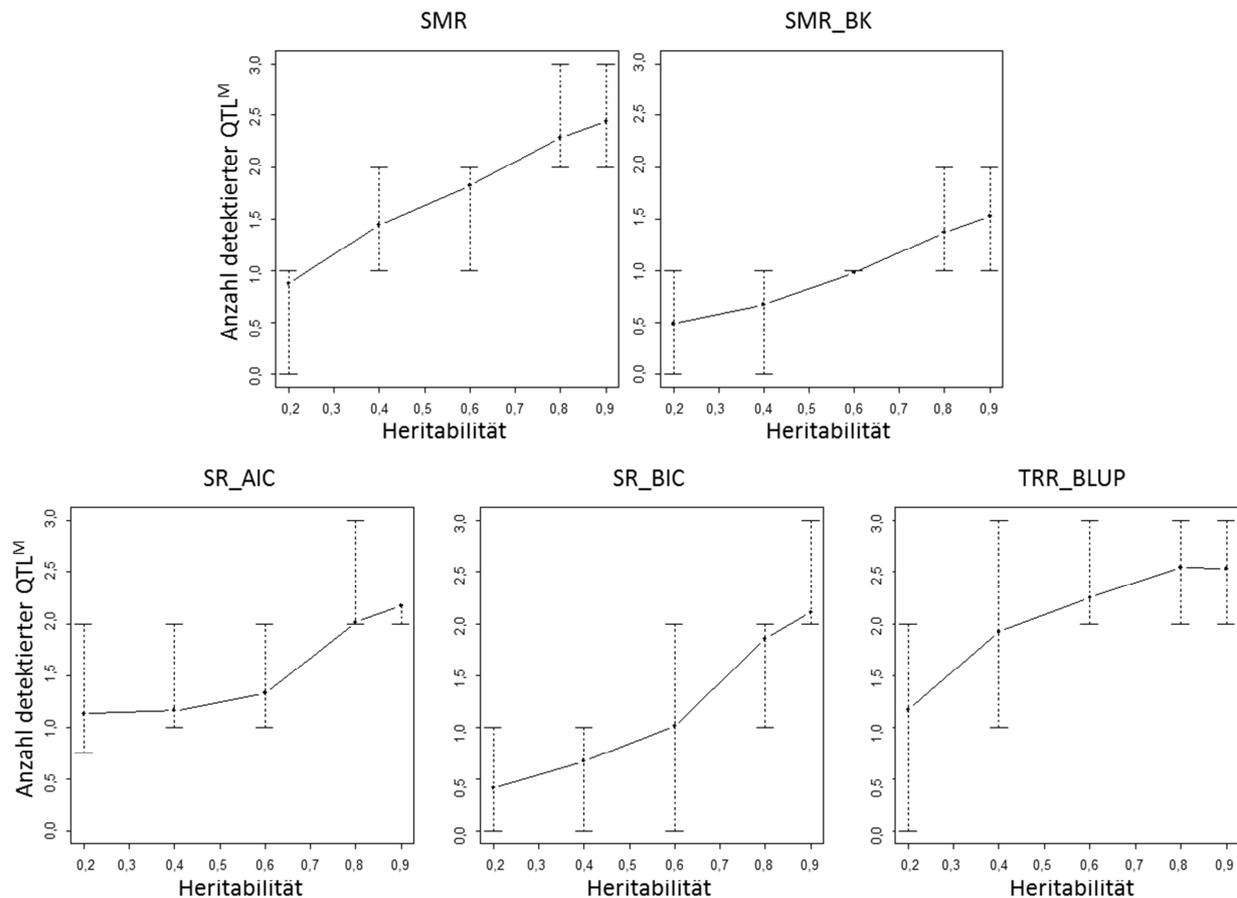


Abbildung 11 Leistung der getesteten statistischen Verfahren in der Lokalisation der drei QTL mit größtem Effekt (QTL^M).

Die Fähigkeit der getesteten statistischen Verfahren, in Abhängigkeit von der Heritabilität die drei simulierten QTL mit dem größten Effekt (QTL^M) zu detektieren, ist in Abbildung 11 dargestellt. Mit steigender Heritabilität nahm die Anzahl der richtig detektierten QTL^M in allen getesteten statistischen Verfahren zu. Eine Ausnahme stellt dabei TRR_BLUP dar, da in diesem Verfahren das Maximum der Anzahl der richtig detektierten QTL^M bei $h^2 = 0,8$ erreicht wurde und bei $h^2 = 0,9$ abfiel. Bis auf SMR_BK lag das Maximum der Anzahl der richtig detektierten QTL^M in Abhängigkeit von der Heritabilität bei allen Verfahren deutlich über 2,00, d.h. im Durchschnitt wurden mindestens zwei der drei simulierten QTL^M richtig lokalisiert. SMR_BK identifizierte im Mittel maximal 1,53 der drei simulierten QTL^M richtig. Deutliche Unterschiede zwischen den Verfahren zeigten sich zudem bei $h^2 \leq 0,60$. So war in den Verfahren SMR_BK und SR_BIC eine Heritabilität größer als 0,60 nötig, um im Mittel mindestens einen der drei QTL^M erfolgreich zu lokalisieren. Die Verfahren

SMR, SR_AIC und TRR_BLUP identifizierten hingegen bei $h^2 = 0,6$ durchschnittlich 1,82, 1,33 und 2,26 der QTL^M korrekt.

Um das ausgeprägte LD, insbesondere zwischen benachbarten Zielregionen, zu berücksichtigen, wurden in Szenario 2 sowohl die Zielregion, auf welcher der simulierte QTL tatsächlich lokalisiert war als auch jeweils die beiden direkt benachbarten Zielregionen als erfolgreiche Lokalisation gewertet. Dies hatte keine Auswirkung auf die Rangierung der statistischen Verfahren hinsichtlich Sensitivität und Spezifität, jedoch war in allen getesteten Verfahren eine deutliche Verbesserung der Sensitivität festzustellen (Tabelle A 1 im Anhang). So erreichten alle getesteten statistischen Verfahren bei $h^2 = 0,90$ eine durchschnittliche Sensitivität $> 0,65$, ausgenommen SMR_BK (mittlere Sensitivität bei $h^2 = 0,90$ war 0,51). Es wurden also immer mehr als 50% der simulierten QTL erfolgreich lokalisiert. Über den gesamten simulierten Heritabilitätsbereich betrachtet, zeigten AIC und SMR die stärkste und BIC die geringste Verbesserung der Sensitivität unter Berücksichtigung des LD. Die Modellselektion basierend auf AIC profitierte dabei bei allen Heritabilitäten in ähnlichem Ausmaß von der Berücksichtigung des LD. SMR zeigte eine überproportionale Verbesserung, insbesondere bei kleinem h^2 . In allen statistischen Verfahren konnten unabhängig von der Heritabilität alle drei simulierten QTL^M mit größten Effekten erfolgreich wiedergefunden werden.

Aufgrund der hohen Spezifität und der gleichzeitig deutlichen Verbesserung der Sensitivität in Folge höhere Heritabilitäten erschien die schrittweise Regression in Kombination mit dem Modellvergleich basierend auf dem BIC (SR_BIC) als die geeignetste der getesteten Methoden, um in der Mais IL die beobachtete phänotypische Variation spezifischen Genomregionen zuordnen zu können. Aus diesem Grund wurde SR_BIC in allen Versuchen mit der Mais IL für die Lokalisation einzelner Genomregionen, die die phänotypische Ausprägung beeinflussen, verwendet.

3.4. Ausprägung des Merkmals $\Delta^{13}\text{C}$ in der Introgressionsbibliothek unter optimaler Wasserverfügbarkeit

3.4.1. Genotypische Variation von $\Delta^{13}\text{C}$ in der Introgressionsbibliothek

Die phänotypische Ausprägung von $\Delta^{13}\text{C}_K$ wird von genetischen Faktoren bestimmt und erweist sich als hoch heritabel.

Im Mittel über die IL betragen die $\Delta^{13}\text{C}_K$ Werte der Körner im Feld und im GWH11 jeweils 5,13 ‰ und 5,97 ‰ mit einem Wertebereich zwischen 4,24 ‰ und 5,84 ‰ bzw. 4,98 ‰ bis 6,55 ‰ (Tabelle 6). Die im GWH11 ermittelten $\Delta^{13}\text{C}_B$ Werte der Kolbenblätter unterschieden sich sowohl im Mittel der IL Population (6,04 ‰) als auch für IL-RE (6,07 ‰) nicht signifikant von den $\Delta^{13}\text{C}_K$ Werten. Der Wertebereich von $\Delta^{13}\text{C}_B$ lag zwischen 5,42 ‰ und 6,98 ‰. Die Differenz zwischen Maximum und Minimum von $\Delta^{13}\text{C}_B$ entsprach der von $\Delta^{13}\text{C}_K$.

Wie erwartet, entsprach die durchschnittliche Merkmalsausprägung der IL Population in allen Merkmalen mit signifikanter genotypischer Variation annähernd der des rekurrenten Elters IL-RE. Aufgrund der sehr unterschiedlichen Phänotypen der beiden Eltern der IL war zu erwarten, dass die Introgression von Genomfragmenten des Hartmais Elters IL-DE in den einzelnen IL Linien zu einer beschleunigten Entwicklung und einer geringeren Wuchshöhe, verglichen mit IL-RE, führte. Es wurde jedoch in allen Merkmalen eine transgressive Spaltung beobachtet, d.h. IL Linien, die eine extremere Merkmalsausprägung als beide Eltern zeigten. Dies deutet auf die Spaltung von mehreren Genen hin, deren allelische Effekte die Ausprägung der jeweiligen phänotypischen Merkmale sowohl erhöhen als auch verringern.

Die Analyse über beide Umwelten (Feld und GWH11) ergab eine hoch signifikante genotypische Variation für $\Delta^{13}\text{C}_K$ mit einer geschätzten Heritabilität von 0,69 (Tabelle 7). Dies zeigt klar, dass die phänotypische Ausprägung von $\Delta^{13}\text{C}_K$ durch genetische Faktoren bestimmt wird.

Tabelle 6 Phänotypischer Mittelwert des rekurrenten Elters (IL-RE) und Mittelwert, Minimum, Maximum der Introgressionslinien (IL Linien) von acht Merkmalen erfasst unter Feld- (N = 89) und von acht Merkmalen erfasst unter Gewächshaus 2011 (GWH11) Bedingungen (N = 77) sowie ein Merkmal erfasst in einem Klimakammerversuch (GV, N = 89).

Merkmal ^a	Umwelt	IL-RE	IL Linien			
			Mittel \pm	s.e. ^b	Min.	Max.
$\Delta^{13}\text{C}_K$	Feld	5,07	5,13 \pm	0,13	4,24	5,84
	GWH11	5,96	5,97 \pm	0,17	4,98	6,55
$\Delta^{13}\text{C}_B$	GWH11	6,07	6,04 \pm	0,22	5,42	6,98
BLW	Feld	105,00	105,08 \pm	1,11	98,67	109,00
	GWH11	68,94	69,15 \pm	0,97	66,17	73,00
BLM	Feld	105,33	104,52 \pm	1,02	99,67	108,00
	GWH11	69,39	69,80 \pm	0,72	67,67	72,00
WH	Feld	175,83	170,80 \pm	5,49	136,67	199,34
	GWH11	224,67	212,63 \pm	7,85	176,17	248,33
SenL	Feld	1,28	1,33 \pm	0,38	0,45	2,22
	GWH11	7,61	7,66 \pm	0,82	5,33	11,67
SPAD	Feld	41,78	42,36 \pm	1,70	32,30	49,23
	GWH11	37,26	36,88 \pm	1,51	32,35	41,83
$F_vF_M^{-1}$	Feld	810,50	803,15 \pm	11,56	764,33	837,00
	GWH11	832,67	819,39 \pm	14,70	762,33	846,33
AK	Feld	98,03	165,86 \pm	25,38	17,87	350,27
GV	Klimakammer	86,00	84,63 \pm	4,51	42,67	100,00

^a $\Delta^{13}\text{C}_K$; Kohlenstoffisotopendiskriminierung in den Körnern [‰], $\Delta^{13}\text{C}_B$; Kohlenstoffisotopendiskriminierung in den Blättern [‰], BLW; Anzahl Tage bis zur weiblichen Blüte [Tage], BLM; Anzahl Tage bis zur männlichen Blüte [Tage], WH; Wuchshöhe [cm], SenL; Prozent seneszenter Blätter [%], SPAD; Chlorophyllgehalt des Kolbenblattes, $F_vF_M^{-1}$; maximale Photosynthesekapazität, AK; Anzahl Körner je Pflanze, GV; Keimlingstriebkraft [%]
^b s.e.; Standardfehler des Mittelwertes

Die phänotypische Ausprägung von $\Delta^{13}\text{C}_K$ zeigte sich stabil über beide Umwelten. Es wurde keine signifikante Genotyp-Umwelt Interaktion festgestellt und die phänotypische Korrelation zwischen $\Delta^{13}\text{C}_K$ im Feld und $\Delta^{13}\text{C}_K$ im GWH11 betrug 0,52.

Tabelle 7 Schätzwerte der genotypischen (σ^2_g), Genotyp-Umwelt Interaktion (σ^2_{ge}) und Fehler (σ^2) Varianzkomponenten sowie Heritabilitäten (h^2) mit unterem (h^2_u) und oberem (h^2_o) Konfidenzintervall der Heritabilität für sieben Merkmale erfasst in beiden Umwelten (Feld und Gewächshaus 2011 (GWH11)).

Merkmal ^a	Varianzkomponenten			h^2	h^2_u	h^2_o
	σ^2_g	σ^2_{ge}	σ^2			
$\Delta^{13}C_K$	0,041**	0,008	0,131	0,69	0,58	0,78
BLW	0,843**	0,594*	5,087	0,49	0,32	0,64
BLM	0,354*	0,497**	3,140	0,37	0,15	0,55
WH	152,450**	0,000	272,480	0,83	0,78	0,88
SenL	0,016	0,456	2,758	- ^b	-	-
SPAD	1,909**	0,981	12,150	0,51	0,34	0,65
$F_vF_M^{-1}$	0,022	28,084	820,194	- ^b	-	-

^a $\Delta^{13}C_K$; Kohlenstoffdiskriminierung in den Körnern, BLW; Anzahl Tage bis zur weiblichen Blüte, BLM; Anzahl Tage bis zur männlichen Blüte, WH; Wuchshöhe, SenL; Prozent seneszenten Blätter, SPAD; Chlorophyllgehalt des Kolbenblattes, $F_vF_M^{-1}$; maximale Photosynthesekapazität

^b nicht signifikant bei $P < 0,05$

* signifikant bei $P < 0,05$; ** $P < 0,01$

Auch in der Analyse der Einzelumwelten konnten jeweils signifikante genotypische Varianzkomponenten für $\Delta^{13}C_K$ nachgewiesen werden, wobei die Wiederholbarkeit bei 0,44 ($\pm 0,06$) im Feld und 0,27 ($\pm 0,05$) im GWH11 lag (Tabelle 8).

Die Wiederholbarkeit von $\Delta^{13}C_B$ im GWH11 betrug 0,16 ($\pm 0,07$) und war somit deutlich geringer als die Wiederholbarkeit von $\Delta^{13}C_K$. Dennoch ergab sich auch für $\Delta^{13}C_B$ eine signifikante ($P < 0,01$) genotypische Varianzkomponente.

Tabelle 8 Schätzwerte aus den Einzelumwelten für genotypische (σ^2_g) und Fehler (σ^2) Varianzkomponenten sowie Schätzwerte für die Wiederholbarkeit (Rep.) für acht im Feld und acht im Gewächshaus 2011 (GWH11) erfasste Merkmale sowie ein in Klimakammern erfasstes Merkmal.

Merkmal ^a	Umwelt	σ^2_g	σ^2	Rep.
$\Delta^{13}C_K$	Feld	0,04	0,05	0,44
	GWH11	0,06	0,16	0,27
$\Delta^{13}C_B$	GWH11	0,03	0,14	0,16
BLW	Feld	2,58	3,70	0,41
	GWH11	0,94	5,68	0,14
BLM	Feld	1,58	3,11	0,34
	GWH11	0,43	3,07	0,12
WH	Feld	112,76	90,51	0,55
	GWH11	191,12	369,38	0,34
SenL	Feld	- ^b	-	-
	GWH11	0,89	4,04	0,18
SPAD	Feld	5,07	8,66	0,37
	GWH11	2,17	13,63	0,14
$F_V F_M^{-1}$	Feld	- ^b	-	-
	GWH11	- ^b	-	-
AK	Feld	3729,20	1932,10	0,66
GV	Klimakammer	99,51	61,04	0,62

^a $\Delta^{13}C_K$; Kohlenstoffisotopendiskriminierung in den Körnern, $\Delta^{13}C_B$; Kohlenstoffisotopendiskriminierung in den Blättern, BLW; Anzahl Tage bis zur weiblichen Blüte, BLM; Anzahl Tage bis zur männlichen Blüte, WH; Wuchshöhe, SenL; Prozent seneszenten Blätter, SPAD; Chlorophyllgehalt des Kolbenblattes, $F_V F_M^{-1}$; maximale Photosynthesekapazität, AK, Anzahl Körner je Pflanze, GV, Keimlingstriebkraft, Rep., Wiederholbarkeit

^b nicht signifikant bei $P < 0,05$

3.4.2. Genotypische Variation in Merkmalen der Pflanzenentwicklung und Pflanzenphysiologie

Die IL zeigt neben dem Merkmal $\Delta^{13}C_K$ auch für den Großteil der erfassten Merkmale der Pflanzenentwicklung und Pflanzenphysiologie signifikante genotypische Varianz.

Über Umwelten hinweg wurden signifikante Varianzkomponenten für die Merkmale Anzahl Tage bis zur männlichen Blüte (BLM), Anzahl Tage bis zur weiblichen Blüte (BLW) und Wuchshöhe detektiert (WH). Ebenso ergab die statistische Analyse eine signifikante genotypische Varianzkomponente für den Chlorophyllgehalt des Kolbenblattes (SPAD) über Feld und GWH11 hinweg. Für das Merkmal der maximalen Photosynthesekapazität ($F_v F_m^{-1}$) konnte weder in den Einzelumwelten noch über Umwelten hinweg eine signifikante genotypische Varianz festgestellt werden (Tabelle 8). Alle Merkmale, die eine signifikante genotypische Varianzkomponente in den beiden Einzelumwelten zeigten, hatten auch über beide Umwelten eine solche. Für das Merkmal Prozent seneszenten Blätter (SenL) war die genotypische Varianzkomponente nur in GWH11 signifikant. Das Merkmal Anzahl Körner je Pflanze (AK), das nur im Feld erfasst wurde, zeigte ebenfalls signifikante genotypische Varianz. Für das in einem Klimakammerversuch erfasste Merkmal der Keimlingstriebkraft wurde ebenfalls eine signifikante genotypische Varianzkomponente detektiert.

3.4.3. Introgressionslinien mit signifikantem Effekt in $\Delta^{13}\text{C}$

Vier IL Linien unterscheiden sich in $\Delta^{13}\text{C}_K$ signifikant von IL-RE über Feld und GWH11.

Mit dem statistisch konservativen Dunnett Test (Dunnett, 1955) wurden IL Linien identifiziert, die sich signifikant vom rekurrenten Elter in $\Delta^{13}\text{C}_K$ und in Merkmalen der Pflanzenentwicklung unterschieden. In Abbildung 12 B sind die IL Linien IL-05, IL-70 und IL-81 hervorgehoben, die eine signifikante Abweichung in $\Delta^{13}\text{C}_K$ von IL-RE im Feldversuch zeigten. Neben diesen IL Linien zeigte die Linie IL-32 signifikant höhere $\Delta^{13}\text{C}_K$ Werte als IL-RE unter Feldbedingungen, wurde jedoch nicht im GWH12 getestet. IL-05 hatte signifikant niedrigere, IL-70 und IL-81 zeigten signifikant höhere $\Delta^{13}\text{C}_K$ Werte als IL-RE. Die signifikant niedrigeren $\Delta^{13}\text{C}_K$ Werte von IL-05 bestätigten sich im Gewächshausversuch. Obwohl IL-81 auch im Gewächshaus deutlich höhere $\Delta^{13}\text{C}_K$ Werte zeigte als IL-RE war dieser Unterschied, basierend auf dem Dunnett Test, nicht signifikant. Die Linie IL-49 unterschied sich in $\Delta^{13}\text{C}_K$ weder im Feldversuch noch im Gewächshausversuch signifikant vom rekurrenten Elter, jedoch zeigte die

kombinierte Analyse beider Versuche einen signifikanten Unterschied zwischen IL-49 und IL-RE für das Merkmal $\Delta^{13}\text{C}_K$.

Im Gewächshausversuch zeigte IL-80 signifikant niedrigere $\Delta^{13}\text{C}_K$ Werte, verglichen mit IL-RE. Dies bestätigte sich auch in der kombinierten Analyse beider Umwelten. Die Differenz in $\Delta^{13}\text{C}_K$ zwischen IL-70 und IL-RE konnte weder im Gewächshausversuch noch in der kombinierten Analyse über Umwelten bestätigt werden.

Die hochauflösende Genotypisierung der Introgressionsbibliothek ergab, dass IL-05 vier Donorgenomfragmente trägt (Abbildung 12 A). Davon befindet sich eines auf Chromosom 1 mit einer Länge von 142,69 Mb, ein zweites befindet sich auf Chromosom 2 (3,83 Mb). Die beiden verbleibenden Donorgenomfragmente befinden sich benachbart auf Chromosom 7 mit jeweils 16,17 Mb und 114,70 Mb Länge. IL-49 trägt ein kleines (2,8 Mb) Donorgenomfragment auf Chromosom 6. IL-80 zeigt drei Donorgenomfragmente, zwei (180.80 Mb und 9.22 Mb) auf Chromosom 2 und eines auf Chromosom 9 (2.65 Mb). Dabei überlappt das kleinere Donorgenomfragment von Chromosom 2 mit dem Donorgenomfragment der IL-05. IL-81 beinhaltet ein Donorgenomfragment auf Chromosom 10 mit 137,47 Mb Länge.

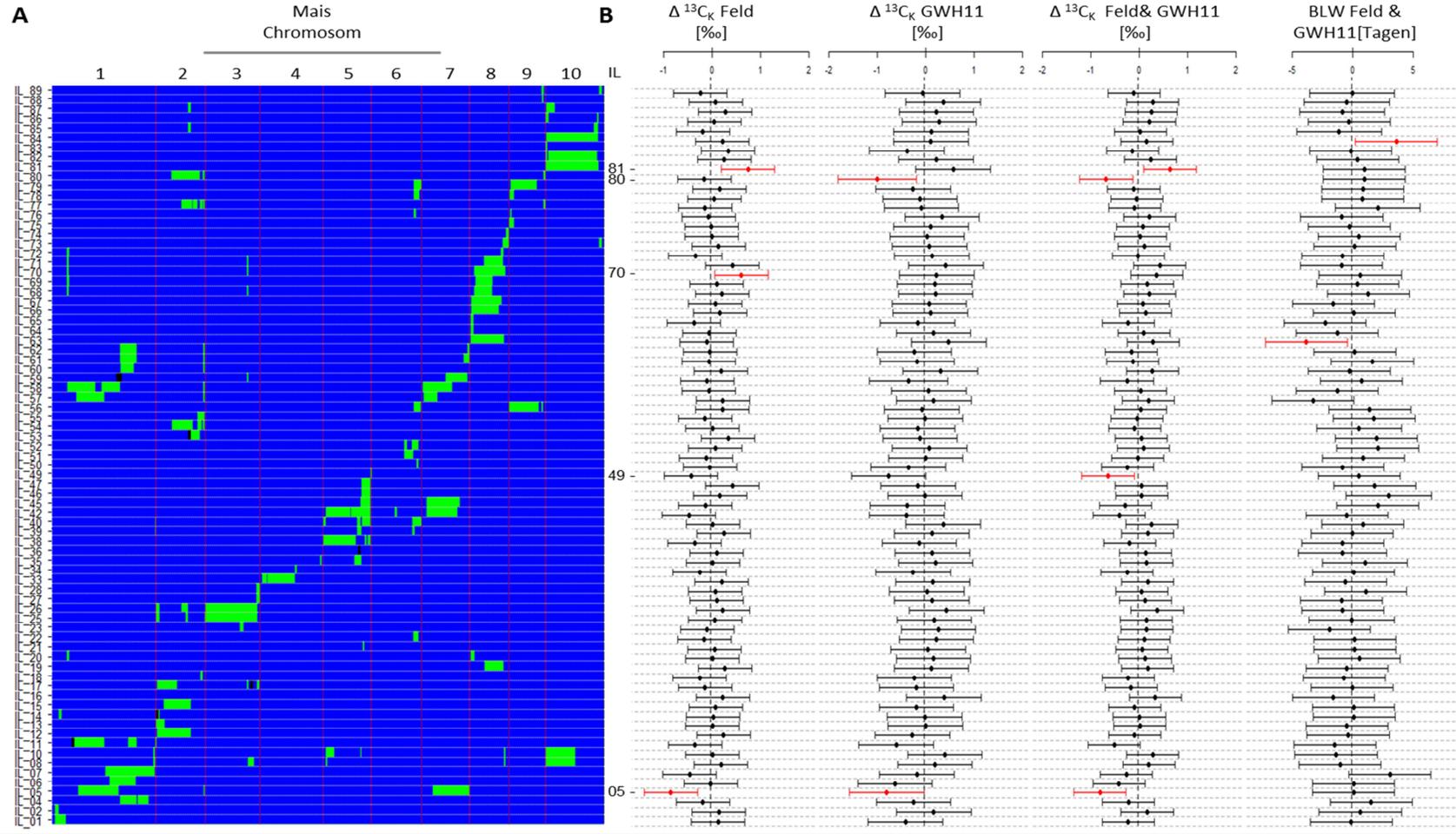


Abbildung 12 **A** Übersicht über die Genotypen von 77 IL Linien basierend auf 1.861 SNP Markern. Homozygote Allele von IL-DE sind in grün, homozygote Allele von IL-RE in blau und heterozygote Allele sind in schwarz dargestellt. **B** Die jeweilige Linienleistung für die Kohlenstoffisotopendiskriminierung ($\Delta^{13}C_K$) im Feld und im Gewächshaus 2011 (GWH11), sowie über diese beiden Experimente für $\Delta^{13}C_K$ und weibliche Blüte (BLW) ist als Kontrast zwischen der Leistung der individuellen IL Linie relativ zu IL-RE (vertikale gestrichelte Linie) dargestellt. Die horizontalen Linien stellen die jeweiligen Grenzen des 95 % Konfidenzintervalls basierend auf dem Dunnett Test dar. IL Linien, die sich signifikant ($\alpha = 0,05$) in ihrer Leistung von IL-RE unterscheiden, sind in rot dargestellt.

3.4.4. Korrelation von $\Delta^{13}\text{C}$ mit Merkmalen der Pflanzenentwicklung und der Pflanzenphysiologie

Die genotypische Variation in $\Delta^{13}\text{C}_K$ ist in der IL weitgehend unabhängig von der Variation in der Pflanzenentwicklung.

Um die Abhängigkeit der genotypischen Variation in $\Delta^{13}\text{C}_K$ von der Pflanzenentwicklung und von Merkmalen der Pflanzenphysiologie innerhalb der IL zu quantifizieren, wurden die Korrelationen zwischen $\Delta^{13}\text{C}_K$ und Merkmalen der Pflanzenentwicklung bzw. Pflanzenphysiologie analysiert.

Tabelle 9 Phänotypische (oberhalb der Diagonalen) und genotypische (unterhalb der Diagonalen) Korrelationskoeffizienten zwischen sieben Merkmalen basierend auf 77 IL Linien getestet in Feld-, Gewächshaus 2011- (GWH11) und Klimakammerversuchen.

Merkmal	$\Delta^{13}\text{C}_K$	BLW	BLM	WH	SenL	SPAD
$\Delta^{13}\text{C}_K$		-0,06	0,06	0,08	0,02	-0,43*
BLW	-0,08		0,58*	0,20	0,21	-0,05
BLM	0,08	0,62 ⁺⁺		0,22	-0,05	-0,16
WH	0,13	0,32 ⁺⁺	0,34 ⁺⁺		-0,04	0,13
SenL	0,00	0,32 ⁺	0,05	0,00		-0,21
SPAD	-0,57 ⁺⁺	0,00	-0,24 ⁺	0,04	-0,08	
GV	-0,11	-0,17	-0,22	0,00	-0,04	0,12

$\Delta^{13}\text{C}_K$; Kohlenstoffdiskriminierung in den Körnern, BLW; Anzahl Tage bis zur weiblichen Blüte, BLM; Anzahl Tage bis zur männlichen Blüte, WH; Wuchshöhe, SenL; Prozent seneszenten Blätter, SPAD; Chlorophyllgehalt des Kolbenblattes, GV; Keimlingtriebkraft

* signifikant bei $P < 0,01$

⁺, ⁺⁺ der genotypische Korrelationskoeffizient übertrifft den doppelten bzw. dreifachen Standardfehler

Basierend auf den Mittelwerten aus den Einzelumwelten konnte weder eine signifikante phänotypische, noch eine signifikante genotypische Korrelation zwischen $\Delta^{13}\text{C}_K$ und einem entwicklungsbeschreibenden Merkmal festgestellt werden (Tabelle 9). Somit kann die genotypische Variation in $\Delta^{13}\text{C}_K$ nicht auf genotypische Unterschiede in Blühzeitpunkt, Wuchshöhe, dem Einsetzen der Abreife oder der Keimlingtriebkraft zurückgeführt werden.

Basierend auf den Mittelwerten aus den Einzelumwelten ergab die statistische Auswertung eine signifikante ($P < 0,01$) negative phänotypische und genotypische Korrelation zwischen $\Delta^{13}\text{C}_K$ und dem Chlorophyllgehalt des Kolbenblattes (Abbildung 13, Tabelle 9). Dieser negative Zusammenhang zwischen $\Delta^{13}\text{C}_K$ und SPAD wurde ebenfalls unabhängig in beiden Umwelten, Feld und GWH11, detektiert.

In den Merkmalen, die jeweils nur in einer der beiden Umwelten erfasst wurden, ergab die statistische Analyse einen signifikanten Zusammenhang zwischen $\Delta^{13}\text{C}_K$ und der Anzahl an Körnern je Einzelpflanze im Feld sowie eine signifikante positive Korrelation zwischen $\Delta^{13}\text{C}_K$ und $\Delta^{13}\text{C}_B$. Zudem korrelierte auch $\Delta^{13}\text{C}_B$ signifikant mit SPAD (Tabelle 10).

Tabelle 10 Phänotypische Korrelationskoeffizienten innerhalb des Feld- (unterhalb der Diagonalen) und Gewächshaus 2011- Versuches (GWH11, oberhalb der Diagonalen) zwischen sieben Merkmalen basierend auf den Mittelwerten von 77 IL Linien getestet im Feld und GWH11.

	$\Delta^{13}\text{C}_K$	BLW	BLM	WH	SenL	SPAD	$\Delta^{13}\text{C}_B$
$\Delta^{13}\text{C}_K$		-0,26*	-0,03	0,05	0,01	-0,38*	0,31*
BLW	0,18		0,46*	0,00	0,37*	-0,15	-0,03
BLM	0,11	0,60*		0,06	-0,16	-0,01	-0,18
WH	0,12	0,18	0,12		0,02	0,07	-0,07
SenL	-	-	-	-		-0,24	0,15
SPAD	-0,39*	-0,02	-0,19	0,28	-		-0,32*
AK	-0,39*	-0,32*	-0,06	0,04	-	0,24	

$\Delta^{13}\text{C}_K$; Kohlenstoffdiskriminierung in den Körnern, $\Delta^{13}\text{C}_B$; Kohlenstoffdiskriminierung in den Blättern, BLW; Anzahl Tage bis zur weiblichen Blüte, BLM; Anzahl Tage bis zur männlichen Blüte, WH; Wuchshöhe, SenL; Prozent seneszenten Blätter, SPAD; Chlorophyllgehalt des Kolbenblattes, AK; Anzahl Körner je Pflanze

* signifikant bei $P < 0,01$

Keine der IL Linien, die sich in $\Delta^{13}\text{C}_K$ im Feld und GWH11 signifikant von IL-RE unterschieden, zeigte einen signifikanten Unterschied zu IL-RE in einem der untersuchten Merkmale der Pflanzenentwicklung bzw. Pflanzenphysiologie. Aufgrund der signifikanten Korrelation zwischen $\Delta^{13}\text{C}_K$ und SPAD wurde das Auftreten von IL Linien erwartet, die sich sowohl in $\Delta^{13}\text{C}_K$ als auch in SPAD signifikant von IL-RE unterscheiden. Jedoch zeigten nur im Feldversuch die IL Linien IL-25 und IL-56 signifikant höhere oder niedrigere Chlorophyllgehalte im Kolbenblatt.

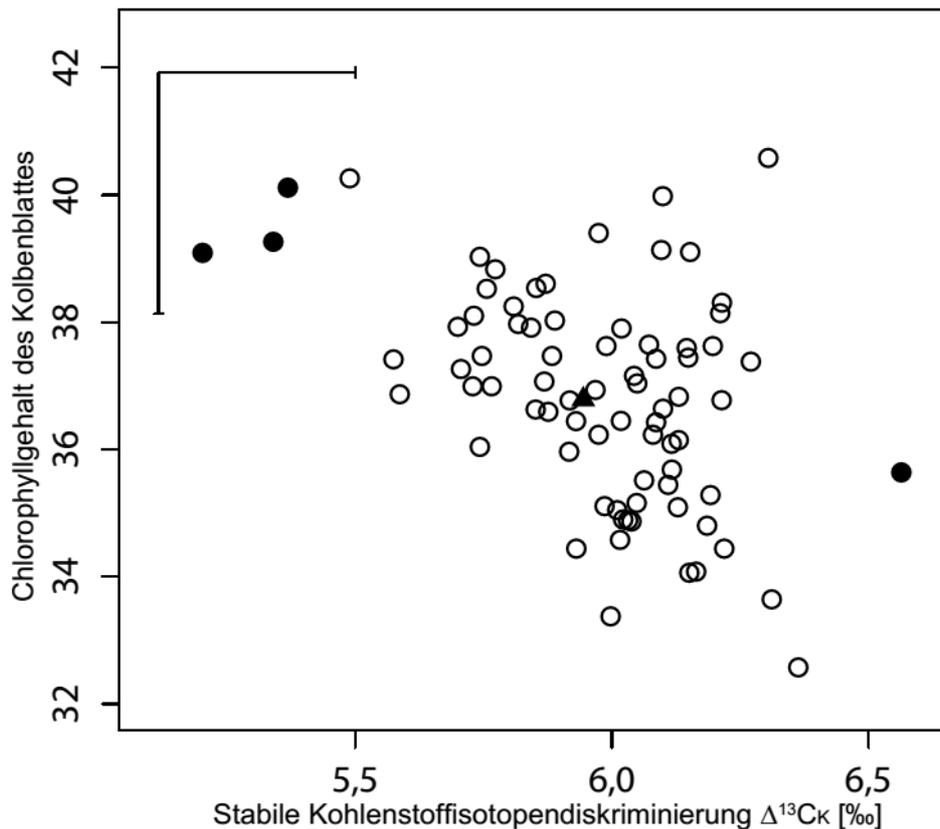


Abbildung 13 Zusammenhang zwischen dem Chlorophyllgehalt des Kolbenblattes (SPAD) und der stabilen Kohlenstoffisotopendiskriminierung ($\Delta^{13}C_K$) basierend auf 77 IL Linien. Schwarze Punkte bezeichnen die adjustierten Mittelwerte über Umwelten der IL Linien, die sich signifikant ($P < 0,05$) von IL-RE (schwarzes Dreieck) in $\Delta^{13}C_K$ unterscheiden. Helle Kreise bezeichnen die adjustierten Mittelwerte über Umwelten der IL Linien, die sich nicht signifikant von IL-RE in $\Delta^{13}C_K$ unterscheiden. Die kleinste gesicherte Differenz (least significant difference, LSD, $P = 0,05$) der adjustierten Mittelwerte für SPAD (LSD = 3,89) und $\Delta^{13}C_K$ (LSD = 0,35 ‰) ist im linken oberen Teil der Graphik dargestellt.

Obwohl die genotypische Varianzkomponente signifikant war, identifizierte der Dunnett Test keine IL Linie mit signifikantem Unterschied zu IL-RE in der kombinierten Analyse der beiden Versuche. Ebenso konnte, obwohl die Varianzanalyse eine signifikante genotypische Varianz für $\Delta^{13}C_B$ in GWH11 ergab, für dieses Merkmal keine IL Linie detektiert werden, die sich signifikant von IL-RE unterschied.

3.4.5. Lokalisation von Donorgenomregionen mit Einfluss auf $\Delta^{13}\text{C}$ und Merkmalen der Pflanzenentwicklung und der Pflanzenphysiologie

22 Genomregionen sind signifikant mit $\Delta^{13}\text{C}_K$ in der IL assoziiert, wobei fünf dieser Zielregionen gemeinsam 55 % der phänotypischen Varianz erklären.

Die vier IL Linien mit signifikanter Differenz zu IL-RE in $\Delta^{13}\text{C}_K$ über Feld und GWH11 hinweg trugen jeweils ein bis vier Donorgenomfragmente. Basierend auf dem Dunnett Test können mögliche QTL nur auf der Ebene aller Donorgenomfragmente einer IL Linie lokalisiert werden. Um eine genauere Lokalisation genomischer Regionen mit möglichem Einfluss auf die phänotypische Ausprägung von $\Delta^{13}\text{C}_K$ zu ermöglichen, wurden die Donorgenomfragmente nach Falke & Frisch (2011) in nicht-überlappende Zielregionen unterteilt.

Auf Grundlage der 77 im Feld und GWH11 getesteten IL Linien wurden 164 nicht überlappende Zielregionen identifiziert. Diese wurden in einer bidirektionalen multiplen schrittweisen Regressionsanalyse als Prädiktorvariablen eingesetzt und auf ihre Assoziation mit den erfassten phänotypischen Merkmalen getestet.

Von insgesamt 164 Zielregionen wurden 22 identifiziert, die einen signifikanten Zusammenhang mit der Ausprägung von $\Delta^{13}\text{C}_K$ zeigten. Diese 22 Zielregionen waren über alle zehn Mais Chromosomen verteilt (Tabelle 11, Abbildung 14).

Das Modell mit allen 22 Zielregionen als Prädiktorvariablen erklärte 85,5 % der phänotypischen Varianz. Zehn der 22 Zielregionen zeigten einen positiven und 12 Zielregionen einen negativen Effekt auf die $\Delta^{13}\text{C}_K$ Werte. Die absoluten Werte der Substitution der Allele von IL-RE durch die Allele von IL-DE innerhalb einer Zielregion schwankten zwischen 0,06 ‰ auf Chromosom 2, 5 und 8 und 0,31 ‰ auf Chromosom 6.

Den größten Anteil phänotypischer Varianz einer einzelnen Zielregion erklärte die Genomregion (ID_{77IL} 117) auf Chromosom 7, wobei der Anteil an erklärter phänotypischer Varianz dieser Zielregion 15 % betrug. Vier weitere Zielregionen auf den Chromosomen 1, 2, 6 und 9 (ID_{77IL} 23, 39, 94, 151) erklärten ebenfalls jeweils mehr als 5 % der phänotypischen Variation. In einem Modell mit allen 22 Zielregionen erklärten diese fünf Zielregionen 55 % der beobachteten phänotypischen Varianz.

Tabelle 11. Mit $\Delta^{13}\text{C}_K$ assoziierte Zielregionen basierend auf 77 IL Linien evaluiert im Feld und im Gewächshaus 2011 (GWH11).

Ziel-region ID _{77IL}	IL Linie ^a	Chr. ^b	Position der Zielregion ^c [Mb]		Länge der Zielregion [Mb]	ADD ^d [‰]	R _i ^{2e} [%]	Anzahl Gene ^f
			Anfang	Ende				
3		1	17,09	27,72	10,63	-0,12	1,00	237
15	IL-05	1	206,66	217,54	10,88	-0,12	3,00	201
21		1	233,32	242,65	9,33	0,13	3,00	219
23		1	251,44	254,97	3,53	-0,23	9,00	42
29		1	294,50	297,61	3,11	0,09	1,00	65
39	IL-80	2	38,97	60,52	21,55	-0,23	8,00	387
41	IL-80	2	75,31	130,81	55,50	0,16	4,00	504
53		2	222,87	227,75	4,88	-0,06	1,00	42
62		3	189,17	191,48	2,31	0,11	4,00	61
63		3	191,48	197,76	6,28	-0,10	1,00	137
73		4	167,58	170,81	3,23	-0,14	2,00	55
76		5	10,68	19,76	9,08	-0,11	2,00	279
84		5	170,90	183,06	12,16	0,06	1,00	294
94	IL-49	6	0,00	3,17	3,17	-0,31	9,00	29
112		7	14,31	38,69	24,38	0,10	2,00	343
117	IL-05	7	119,20	139,73	20,53	-0,26	15,00	447
130		8	119,48	124,17	4,69	0,06	2,00	81
150		9	151,12	152,80	1,68	0,12	2,00	51
151	IL-80	9	152,80	153,85	1,05	-0,20	6,00	40
155	IL-81	10	5,23	6,42	1,19	-0,09	1,00	18
158	IL-81	10	11,34	25,19	13,85	0,18	4,00	167
163	IL-81	10	135,71	139,20	3,49	0,18	4,00	17

^a IL Linien, die die jeweiligen Zielregionen tragen und signifikant unterschiedlich zu IL-RE in $\Delta^{13}\text{C}_K$ sind basierend auf dem Dunnett Test, ^b Chromosom, ^c geschätzte Grenzen der Zielregionen, ^d additiver Effekt der Donorallele der Zielregion in Relation zu IL-RE, ^e erklärte Prozent der beobachteten phänotypischen Varianz, ^f geschätzte Anzahl von Genen, die für Proteine kodieren, basierend auf B73 Refseq_v2 innerhalb der jeweiligen Zielregion

Die Zielregion auf Chromosom 6, die aufgrund der Introgression der Allele des Donor-Elters für eine Reduktion in $\Delta^{13}\text{C}_K$ von 0,31 ‰ verantwortlich war, befindet sich auf dem Donorgenomfragment der IL Linie IL-49. Diese Zielregion erklärt alleine den signifikanten Unterschied in $\Delta^{13}\text{C}_K$ zwischen IL-49 und IL-RE, welcher zuvor bereits

durch den Dunnett Test identifiziert wurde. Die Zielregionen 39, 117, 151 sind in den Donorgenomfragmenten der Linien IL-05 bzw. IL-80 lokalisiert. Beide IL Linien wurden ebenfalls durch den Dunnett Test als signifikant unterschiedlich von IL-RE in $\Delta^{13}\text{C}_K$ identifiziert. Der signifikante Unterschied in $\Delta^{13}\text{C}_K$ zwischen IL-81 und IL-RE erklärt sich

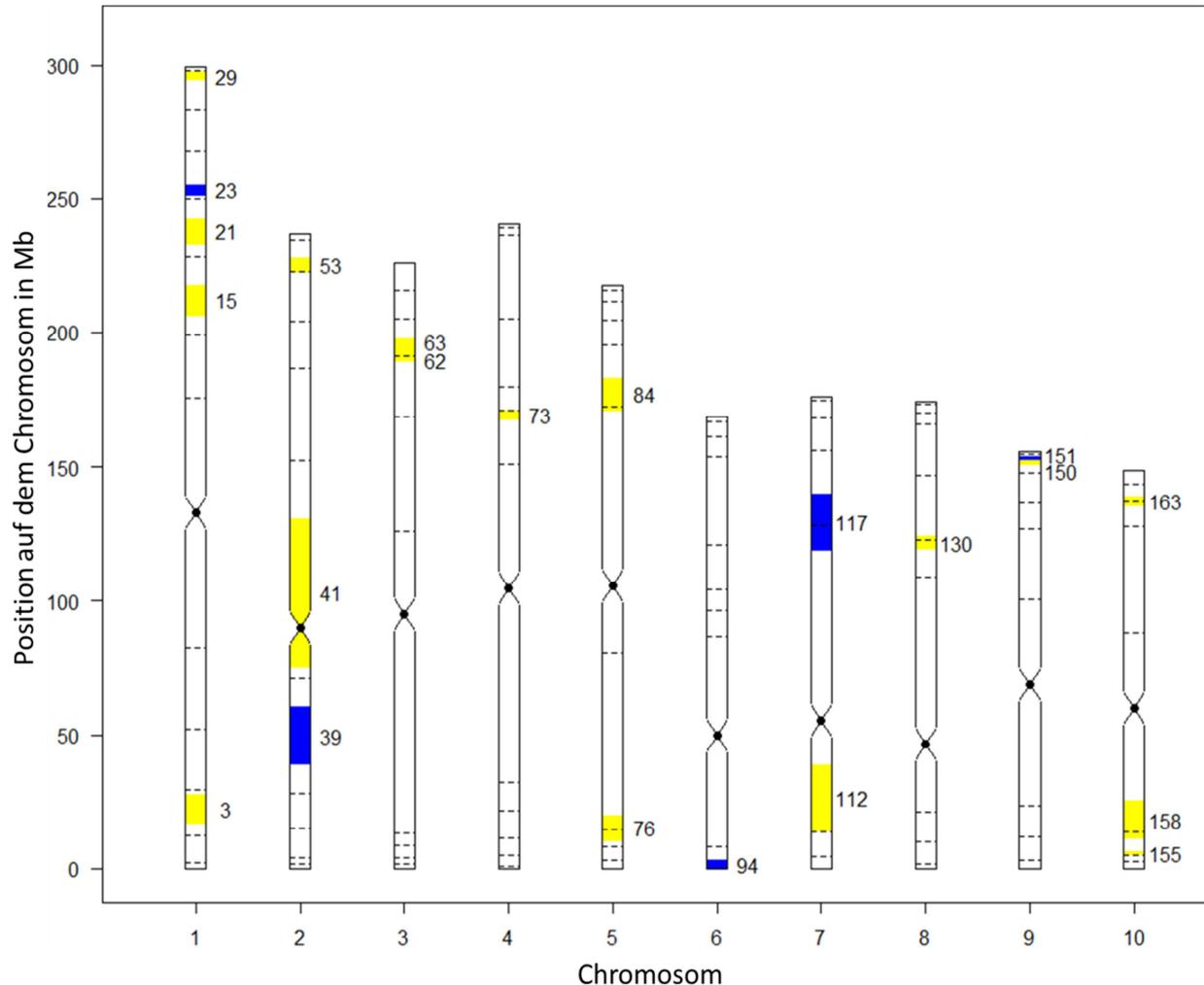


Abbildung 14 Physikalische Position der Zielregionen, die $\Delta^{13}\text{C}_K$ beeinflussen. Die Zielregionen sind ihren ID_{77IL} zugeordnet und erklären mehr (blau) oder weniger (gelb) als 5 % der gesamten phänotypischen Varianz. Die Grenzen der jeweiligen Chromosomen Bins sind durch gestrichelte Linien angedeutet und die Position der Zentromere wird durch schwarze Punkte dargestellt.

durch drei Zielregionen (ID_{77IL} 155, 158, 163). Diese befinden sich alle auf einem einzelnen Donorgenomfragment auf Chromosom 10. Die Donorallele der Zielregion 155 reduzierten $\Delta^{13}\text{C}_K$ um 0,09 ‰, die Donorallele der Zielregionen 158 und 163 sind hingegen mit einer Erhöhung der $\Delta^{13}\text{C}_K$ Werte um jeweils 0,18 ‰ assoziiert, sodass

die Summe der drei Zielregionen das signifikant höhere $\Delta^{13}\text{C}_K$ der IL Linie IL-81 relativ zu IL-RE erklärt.

Um den Einfluss der Länge der einzelnen Zielregionen bzw. den Einfluss der Anzahl an Genen auf diesen Zielregionen auf $\Delta^{13}\text{C}_K$ zu analysieren, wurden die Korrelationen zwischen den geschätzten Effekten der Zielregionen und ihrer Länge bzw. Anzahl an Genen untersucht. Es konnte keine signifikante Korrelation zwischen den jeweiligen absoluten Effekten der Zielregionen und deren physikalischer Länge oder der geschätzten Anzahl an Genen festgestellt werden (Abbildung 15 A+B).

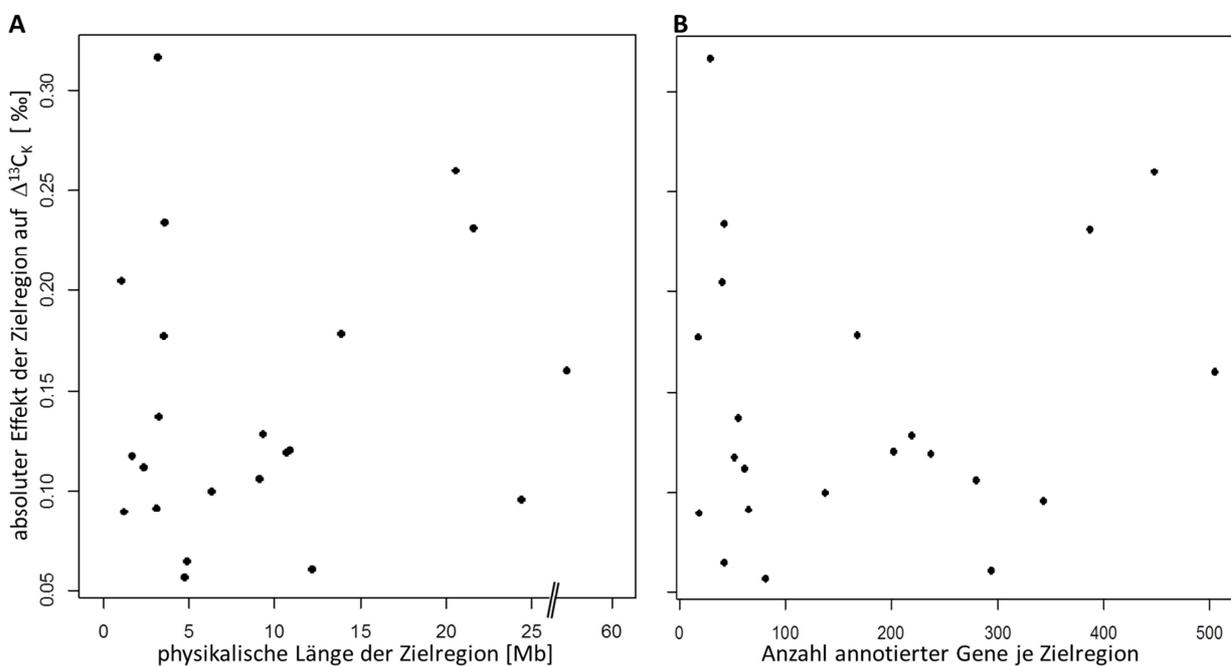


Abbildung 15 Zusammenhang zwischen dem absoluten Effekt einer Zielregion auf $\Delta^{13}\text{C}_K$ und **A** der physikalischen Länge der Zielregionen und **B** der Anzahl an annotierten Genen für die jeweilige Zielregion

Um den Einfluss genotypischer Unterschiede in Merkmalen der Pflanzenentwicklung oder Pflanzenphysiologie auf $\Delta^{13}\text{C}_K$ auf genomischer Ebene zu analysieren, wurden Zielregionen identifiziert, die sowohl einen Einfluss auf $\Delta^{13}\text{C}_K$ als auch auf die Merkmale der Pflanzenentwicklung oder Physiologie zeigten.

Für BLW wurden insgesamt 13 Zielregionen mit signifikantem Einfluss auf dieses Merkmal identifiziert (Tabelle A 2 im Anhang). Diese Zielregionen waren auf den Chromosomen 1, 2, 5, 6, 8, 9 und 10 lokalisiert und erklärten zusammen 67 % der beobachteten phänotypischen Varianz. Da der Donor-Elter IL-DE aus dem

genetischen Pool der Hartmaislinien stammt, war davon auszugehen, dass, verglichen mit IL-RE, die Introgression von Donorallelen in den meisten Fällen zu einer früheren Blüte führen würde. Jedoch verlängerten die Donorallele in 9 der 13 detektierten Zielregionen den Zeitraum von der Aussaat bis zur Blüte. Der größte Effekt einer einzelnen Zielregion auf BLW befand sich auf Chromosom 1 (ID_{77IL} 9), wo die Donorallele zu einer Verfrühung der Blüte um 1,18 Tage führten. In einem Modell mit allen 13 Zielregionen als Prädiktorvariablen erklärte die Zielregion auf Chromosom 1 (ID_{77IL} 9) 13 % der beobachteten phänotypischen Varianz. Eine Zielregion (ID_{77IL} 76), die einen signifikanten Einfluss auf BLW zeigte (-0,53 Tage, $R_1^2 = 4\%$), war auch mit $\Delta^{13}C_K$ assoziiert. Die Donorallele in dieser Zielregion reduzierten $\Delta^{13}C_K$ um 0,11 ‰.

Insgesamt wurden sieben BLM beeinflussende Zielregionen identifiziert. Zusammen erklärten diese sieben Zielregionen 42 % der phänotypischen Varianz. Zwei dieser Zielregionen (ID_{77IL} 5, 133) waren zuvor auch als mit BLW assoziiert identifiziert worden. Die Zielregion ID_{77IL} 29 beeinflusste sowohl BLM als auch $\Delta^{13}C_K$, wobei die Donorallele in dieser Zielregion zu einer Reduktion von BLM und einem Anstieg von $\Delta^{13}C_K$ führten.

Die schrittweise Regression identifizierte fünf Zielregionen mit signifikantem Einfluss auf WH. Diese fünf Regionen befanden sich auf den Chromosomen 1, 3, 5 und 9 und erklärten 44 % der phänotypischen Varianz. Wie erwartet war die Mehrzahl der detektierten Zielregionen, die von IL-DE stammten, mit einer kleineren WH gekoppelt. Den größten Einfluss auf WH zeigte eine Zielregion auf Chromosom 5, die 13 % der phänotypischen Varianz erklärte. Keine der Zielregionen, die mit WH assoziiert war, beeinflusste gleichzeitig $\Delta^{13}C_K$.

Insgesamt wurden 28 Zielregionen mit signifikantem Einfluss auf das Merkmal SPAD identifiziert. Diese waren über alle zehn Chromosomen verteilt und erklärten zusammen 89 % der phänotypischen Varianz. Die Donorallele in 15 dieser Zielregionen reduzierten SPAD und somit den Chlorophyllgehalt des Kolbenblattes. Fünf (ID_{77IL} 29, 76, 94, 130, 151) der 22 Zielregionen, die $\Delta^{13}C_K$ beeinflussten, waren auch mit SPAD assoziiert. Mit Ausnahme einer Zielregion auf Chromosom 1 (ID_{77IL} 29) resultierten die Donorallele dieser Zielregionen in einer Steigerung des Chlorophyllgehalts des Kolbenblattes. Der Effekt dieser fünf Zielregionen auf $\Delta^{13}C_K$ war jedoch nicht einheitlich. Drei der Zielregionen (ID_{77IL} 76, 94, 151) mit negativem Effekt auf SPAD zeigten ebenfalls einen negativen Effekt auf $\Delta^{13}C_K$, eine Zielregion

(ID_{77IL} 130) mit negativem Effekt auf SPAD zeigte einen positiven Effekt auf $\Delta^{13}\text{C}_K$. Interessanterweise war die Zielregion (ID_{77IL} 94), die den stärksten additiven Effekt auf $\Delta^{13}\text{C}_K$ zeigte, gleichzeitig auch mit dem stärksten additiven Effekt auf SPAD assoziiert. Gleichzeitig wurde auch ein signifikanter Einfluss dieser Zielregion auf $\Delta^{13}\text{C}_B$ im GWH11 detektiert. Neben dieser Zielregion (ID_{77IL} 94) auf Chromosom 6 wurden, bedingt durch die große Fehlervarianz, nur zwei weitere Zielregionen auf den Chromosomen 1 und 4 mit signifikantem Einfluss auf $\Delta^{13}\text{C}_B$ identifiziert. In einem Modell erklärten diese drei Zielregionen 17 % der phänotypischen Variation von $\Delta^{13}\text{C}_B$.

Für das Merkmal Keimlingsentwicklung (GV) wurden neun Zielregionen mit signifikantem Einfluss detektiert. In einem Modell mit allen neun Zielregionen als Prädiktorvariablen erklärten diese neun Zielregionen auf den Chromosomen 1, 3, 5, 8, 9 und 10 52 % der phänotypischen Variation. Der größte Anteil an erklärter phänotypischer Varianz war mit Zielregionen auf den Chromosomen 5 und 8 assoziiert. In einem Regressionsmodell mit allen neun Zielregionen erklärten diese beiden Zielregionen 13 % bzw. 11% der phänotypischen Variation. Zwei Zielregionen auf den Chromosomen 1 und 9 waren zudem mit $\Delta^{13}\text{C}_K$ assoziiert. Die Donorallele der Zielregion auf Chromosom 1 reduzierten sowohl $\Delta^{13}\text{C}_K$ als auch GV. Die Donorallele der Zielregion auf Chromosom 9 hingegen erhöhten die $\Delta^{13}\text{C}_K$ Werte, aber verringerten GV.

3.5. Ausprägung des Merkmals $\Delta^{13}\text{C}$ in der Introgressionsbibliothek unter kontrastierender Wasserverfügbarkeit

3.5.1. Genotypische Variation von $\Delta^{13}\text{C}$ und von Merkmalen der Pflanzenentwicklung und Pflanzenphysiologie unter kontrastierender Wasserverfügbarkeit

Wie unter optimaler Wasserverfügbarkeit wurde auch unter suboptimaler Wasserverfügbarkeit eine signifikante genotypische Variation für $\Delta^{13}\text{C}_K$ in der IL detektiert. Über die Behandlungen mit optimaler bzw. suboptimaler Wasserverfügbarkeit tritt eine signifikante Genotyp-Behandlung Interaktion auf.

Auf der Basis der Ergebnisse aus den Feld- und GWH11-Versuchen wurden 33 IL Linien selektiert und im GWH12 unter optimaler und suboptimaler Wasserversorgung getestet. Die 33 IL Linien wurden selektiert, da sie entweder einen signifikanten Effekt in $\Delta^{13}\text{C}_K$ im Feld und GWH11 Versuch gezeigt hatten, oder eine möglichst vollständige Donorgenomabdeckung ermöglichten. So repräsentierten diese 33 IL Linien zusammen 78 % des Donorgenoms. Die $\Delta^{13}\text{C}_K$ Werte der 33 IL Linien lagen unter optimaler Wasserversorgung zwischen 4,23 ‰ und 6,07 ‰, wobei das Mittel 5,43 ‰ betrug (Tabelle 12). Unter suboptimaler Wasserversorgung waren die $\Delta^{13}\text{C}_K$ Werte im Mittel über die 33 IL Linien signifikant höher (5,64 ‰) als unter optimaler Wasserversorgung. Wie bereits in den vorangegangenen Versuchen (Feld, GWH11) beobachtet, entsprach das Mittel in $\Delta^{13}\text{C}_K$ in der optimal bewässerten Variante über die 33 IL Linien dem durchschnittlichen $\Delta^{13}\text{C}_K$ des rekurrenten Elters IL-RE (5,44 ‰). In der Variante mit suboptimaler Wasserversorgung jedoch zeigte IL-RE ein $\Delta^{13}\text{C}_K$ von 5,33 ‰ und lag somit im unteren Wertebereich der 33 selektierten IL Linien. $\Delta^{13}\text{C}_K$ des Donor-Elters IL-DE betrug 5,04 ‰ und 5,30 ‰ in der optimal bzw. reduziert bewässerten Variante. In der optimal bewässerten Variante waren die $\Delta^{13}\text{C}_K$ Werte von IL-DE, basierend auf einem t-Test, somit signifikant niedriger als die $\Delta^{13}\text{C}_K$ Werte von IL-RE. In der Variante mit suboptimaler Bewässerung war $\Delta^{13}\text{C}_K$ zwischen den Eltern der IL nicht signifikant unterschiedlich.

Erwartungsgemäß zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen den beiden Bewässerungsvarianten hinsichtlich der Merkmale der Pflanzenentwicklung und Pflanzenphysiologie.

Tabelle 12 Phänotypischer Mittelwert des Donor-Elters (IL-DE), des rekurrenten Elters (IL-RE) und Mittelwert, Minimum, Maximum von 33 selektierten IL Linien für zehn Merkmale, erfasst im Gewächshausversuch 2012 (GWH12) unter optimaler und suboptimaler Wasserversorgung.

Merkmal ^a	Behandlung	IL-DE	IL-RE	IL Linien			
				Mittel	± s.e.	Min.	Max.
$\Delta^{13}C_K$	optimal	5,04	5,44	5,43	0,12	4,23	6,07
	suboptimal	5,30	5,33	5,63	0,15	5,05	6,08
BLW	optimal	61,27	60,77	60,92	0,62	57,33	67,07
	suboptimal	63,83	67,50	66,51	1,10	62,33	74,44
BLM	optimal	58,12	64,00	63,69	0,79	61,17	68,33
	suboptimal	57,83	64,67	64,06	0,56	61,50	67,45
WH	optimal	190,00	268,67	246,80	8,51	203,83	299,31
	suboptimal	150,17	153,25	153,85	5,98	122,50	189,52
SenL	optimal	0,33	0,00	0,01	0,06	0,00	0,33
	suboptimal	1,33	1,08	0,51	0,34	0,00	1,83
SPAD	optimal	49,11	43,90	44,81	1,14	38,02	49,53
	suboptimal	37,33	25,87	29,23	1,39	23,97	35,28
ASI	optimal	3,17	-2,25	-2,32	0,47	-4,84	-0,17
	suboptimal	6,00	2,83	2,41	1,11	-1,33	8,75
BR	optimal	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	suboptimal	2,42	3,10	2,84	0,22	1,63	4,65
BT	optimal	25,24	25,69	25,80	0,32	24,95	26,62
	suboptimal	29,27	30,31	30,06	0,46	28,98	31,22
AK	optimal	189,17	99,83	127,98	24,34	57,93	278,63
	suboptimal	42,33	7,42	25,45	10,84	1,33	84,41

^a $\Delta^{13}C_K$; Kohlenstoffisotopendiskriminierung in den Körnern [‰], BLW; Anzahl Tage bis zur weiblichen Blüte [Tage], BLM; Anzahl Tage bis zur männlichen Blüte [Tage], WH; Wuchshöhe [cm], SenL; Prozent seneszenter Blätter [%], SPAD; Chlorophyllgehalt des Kolbenblattes, ASI; Anthesis-Silking Intervall [Tage], BR; Blattrollen, BT; Temperatur des Kolbenblattes [°C], AK; Anzahl Körner je Pflanze, s.e.; Standardfehler

So war sowohl im Mittel der 33 IL Linien als auch für IL-DE und IL-RE die weibliche Blüte in der Variante mit suboptimaler Wasserversorgung deutlich verzögert. Interessanterweise war der Unterschied in BLW zwischen den beiden Bewässerungsvarianten für IL-DE signifikant kleiner als für IL-RE oder dem Mittel der IL Linien. Gleichzeitig war der Effekt der suboptimalen Wasserversorgung auf BLM jedoch deutlich geringer, sodass die Differenz aus BLW und BLM (Anthesis-Silking

Intervall) in der suboptimalen Variante, verglichen mit der optimal bewässerten, wie erwartet, deutlich anstieg. Ebenso führte die suboptimale Bewässerung bei allen IL Linien und bei den Eltern der IL zu einer signifikanten Reduktion der Wuchshöhe, einer beschleunigten Abreife, einem geringeren Chlorophyllgehalt des Kolbenblattes, einer höheren Oberflächentemperatur des Kolbenblattes und zu einer signifikant reduzierten Anzahl an Körnern pro Pflanze.

Wie bereits im Feld- und GWH11-Versuch beobachtet, lagen die Mittelwerte über 33 IL Linien in allen erfassten Merkmalen der Pflanzenentwicklung und Pflanzenphysiologie näher an der Leistung des rekurrenten Elters als an der des Donor-Elters.

Gemäß den vorangegangenen Versuchen im Feld und GWH11 wurde eine signifikante genotypische Varianz für $\Delta^{13}\text{C}_K$ in der optimal bewässerten Variante mit einer Wiederholbarkeit von 55 % detektiert (Tabelle 13). Zudem konnte auch eine signifikante genotypische Varianz für $\Delta^{13}\text{C}_K$ unter Bedingungen mit suboptimaler Wasserverfügbarkeit festgestellt werden. Hier betrug die Wiederholbarkeit von $\Delta^{13}\text{C}_K$ 39 % und war somit geringer als unter optimaler Wasserverfügbarkeit.

Die geringere Wiederholbarkeit von $\Delta^{13}\text{C}_K$ unter suboptimaler Wasserversorgung erklärt sich hauptsächlich durch einen größeren Versuchsfehler in dieser Behandlung. Die genotypischen Varianzkomponenten in beiden Behandlungen waren mit 0,10 unter optimaler und 0,09 unter suboptimaler Wasserverfügbarkeit hingegen nahezu identisch. Basierend auf den Mittelwerten der IL Linien ergab sich eine Heritabilität von 0,72 über beide Behandlungen hinweg (Tabelle 14). Die Analyse über beide Behandlungsstufen in GWH12 ergab zudem eine signifikante Varianzkomponente für die Interaktion zwischen Genotyp und Bewässerungsvariante.

Für nahezu alle im GWH12 erfassten Merkmale der Pflanzenentwicklung bzw. Pflanzenphysiologie wurden in der Analyse über beide Behandlungen hinweg signifikante genotypische Varianzkomponenten ermittelt (Tabelle 14). Ausnahmen stellten die Merkmale SenL und BR dar.

Tabelle 13 Schätzwerte der genotypischen (σ^2_g) und Fehler (σ^2) Varianzkomponenten und Wiederholbarkeiten (Rep.) für zehn in Gewächshausversuch 2012 (GWH12) unter optimaler und suboptimaler Wasserverfügbarkeit erfasste Merkmale.

Merkmal ^a	Behandlung	σ^2_g	σ^2	Rep.
$\Delta^{13}C_K$	optimal	0,10	0,08	0,55
	suboptimal	0,09	0,13	0,39
BLW	optimal	2,46	2,30	0,52
	suboptimal	5,51	7,30	0,43
BLM	optimal	2,51	3,75	0,40
	suboptimal	1,93	1,85	0,51
WH	optimal	544,83	434,31	0,56
	suboptimal	205,63	214,79	0,49
SenL	optimal	- ^b	-	-
	suboptimal	- ^b	-	-
SPAD	optimal	5,89	7,78	0,43
	suboptimal	4,61	11,51	0,29
ASI	optimal	0,85	1,32	0,39
	suboptimal	2,50	7,35	0,25
BR	optimal	- ^b	-	-
	suboptimal	0,62	0,29	0,68
BT	optimal	0,10	0,62	0,14
	suboptimal	- ^b	-	-
AK	optimal	1743,45	3555,88	0,33
	suboptimal	328,05	704,47	0,32

^a $\Delta^{13}C_K$; Kohlenstoffisotopendiskriminierung in den Körnern, BLW; Anzahl Tage bis zur weiblichen Blüte, BLM; Anzahl Tage bis zur männlichen Blüte, WH; Wuchshöhe, SenL; Prozent seneszenten Blätter, SPAD; Chlorophyllgehalt des Kolbenblattes, ASI; Anthesis-Silking Intervall, BR; Blattrollen, BT; Temperatur des Kolbenblattes, AK; Anzahl Körner je Pflanze

^b nicht signifikant

Wie erwartet, zeigte bezüglich BR keine der getesteten IL Linien Blattrollen in der optimal bewässerten Behandlung. Unter suboptimaler Wasserverfügbarkeit konnte jedoch eine signifikante genotypische Variation für BR mit einer Wiederholbarkeit von 68 % detektiert werden. SenL zeigte im GWH12 weder in der Behandlung mit optimaler, noch in der mit suboptimaler Wasserverfügbarkeit eine signifikante genotypische Varianz. Von allen erfassten phänotypischen Merkmalen mit

signifikanter genotypischer Varianz zeigte BLM über Behandlungen hinweg die höchste (0,75) und BT die niedrigste (0,45) Heritabilität.

Tabelle 14 Schätzwerte der genotypischen (σ^2_g), Genotyp-Behandlung Interaktion (σ^2_{ge}) und Fehler (σ^2) Varianzkomponenten und Heritabilitäten (h^2) sowie untere (h^2_u) und obere (h^2_o) Grenzen der 95 % Konfidenzintervalle der Heritabilitäten für zehn in beiden Behandlungen im Gewächshausversuch 2012 (GWH12) erfasste Merkmale.

Merkmal ^a	Varianzkomponenten			h^2	h^2_u	h^2_o
	σ^2_g	σ^2_{ge}	σ^2			
$\Delta^{13}C_K$	0,06**	0,03**	0,11	0,72	0,56	0,84
BLW	2,39**	1,57**	4,95	0,67	0,48	0,81
BLM	1,66**	0,63*	2,78	0,75	0,61	0,86
WH	226,21**	149,19**	322,47	0,69	0,52	0,82
SenL	0,01	0,02	0,30	-	-	-
SPAD	2,93**	2,19**	9,69	0,61	0,39	0,77
ASI	1,08*	0,62*	4,40	0,62	0,40	0,78
BR	0,00	0,31**	0,14	-	-	-
BT	0,06*	0,00	0,91	0,45	0,15	0,68
AK	563,37*	440,00**	2112,17	0,59	0,29	0,75

^a $\Delta^{13}C_K$; Kohlenstoffisotopendiskriminierung in den Körnern, BLW; Anzahl Tage bis zur weiblichen Blüte, BLM; Anzahl Tage bis zur männlichen Blüte, WH; Wuchshöhe, SenL; Prozent seneszenten Blätter, SPAD; Chlorophyllgehalt des Kolbenblattes, ASI; Anthesis-Silking Intervall, BR; Blattrollen, BT; Temperatur des Kolbenblattes, AK; Anzahl Körner je Pflanze

*, ** $p < 0,05$ bzw. $0,01$

Die niedrige Heritabilität von BT erklärt sich vornehmlich durch die fehlende genotypische Variation in der Behandlung mit suboptimaler Wasserversorgung. Obwohl BT primär als ein Trockenstress spezifisches Merkmal erachtet wurde, konnte, anders als erwartet, nur unter optimaler Wasserversorgung eine signifikante genotypische Varianz für dieses Merkmal festgestellt werden. Mit Ausnahme von BT ergab sich in allen erfassten Merkmalen mit signifikanter genotypischer Varianzkomponente auch eine signifikante Genotyp–Behandlung Interaktion.

3.5.2. Korrelationen von $\Delta^{13}\text{C}$ mit Merkmalen der Pflanzenentwicklung und Pflanzenphysiologie unter kontrastierender Wasserverfügbarkeit

Unter optimaler Wasserverfügbarkeit korreliert $\Delta^{13}\text{C}_K$ phänotypisch mit SPAD, dem Ertragsparameter Anzahl Körner je Pflanze und der Blattemperatur. Unter suboptimaler Wasserverfügbarkeit korreliert $\Delta^{13}\text{C}_K$ phänotypisch mit dem trockenstresstypischen Merkmal Blattrollen und der Anzahl Körner je Pflanze.

Mögliche Zusammenhänge von $\Delta^{13}\text{C}_K$ mit Merkmalen der Pflanzenentwicklung und Pflanzenphysiologie sollten unter Bedingungen mit optimaler und suboptimaler Wasserverfügbarkeit detektiert werden. Hierfür wurden, basierend auf den adjustierten Mittelwerten der 33 IL Linien und der beiden Eltern der Population, paarweise phänotypische Korrelationen berechnet. In der Behandlung mit optimaler Wasserverfügbarkeit bestätigte sich die bereits im GWH11 und Feld detektierte signifikante negative Korrelation zwischen $\Delta^{13}\text{C}_K$ und SPAD. Die Korrelationskoeffizienten betragen -0,39 im Feld, -0,38 im GWH11 und -0,38 in GWH12_opt (Tabelle 10 und Tabelle 15). Ebenso konnte die signifikante negative Korrelation zwischen $\Delta^{13}\text{C}_K$ und der Anzahl Körner je Pflanze, die zuvor im Feld auftrat, auch im GWH12_opt bestätigt werden. Neben diesen beiden signifikanten Korrelationen wurde ein signifikanter positiver Zusammenhang zwischen $\Delta^{13}\text{C}_K$ und der durchschnittlichen Oberflächentemperatur des Kolbenblattes (BT) in der optimal bewässerten Variante von GWH12 ermittelt.

Unter den Bedingungen mit suboptimaler Wasserverfügbarkeit wurden zwei signifikante Korrelationen zwischen $\Delta^{13}\text{C}_K$ und Merkmalen der Pflanzenphysiologie detektiert. So fand sich ein signifikant negativer Zusammenhang zwischen $\Delta^{13}\text{C}_K$ und dem für Trockenstress spezifischen Merkmal Blattrollen. Über alle 33 IL Linien betrachtet, zeigten somit die Linien mit geringerem $\Delta^{13}\text{C}_K$, also mit einem größerem Anteil an ^{13}C Atomen im Pflanzenmaterial, ein höheres trockenstressbedingtes Blattrollen.

Tabelle 15 Phänotypische Korrelationskoeffizienten zwischen neun phänotypischen Merkmalen mit signifikanter genotypischer Variation unter optimaler (unterhalb der Diagonale) und suboptimaler (oberhalb der Diagonale) Wasserverfügbarkeit, basierend auf 33 IL Linien getestet im Gewächshausversuch 2012 (GWH12).

	$\Delta^{13}C_K$	BLW	BLM	WH	SPAD	ASI	BR	BT	AK
$\Delta^{13}C_K$		-0,07	0,18	0,20	-0,09	-0,29	-0,59*	-	0,40*
BLW	-0,11		0,61*	-0,14	0,06	0,53*	0,07	-	-0,67*
BLM	0,02	0,68*		-0,06	-0,18	-0,34	0,06	-	-0,33
WH	0,33	-0,23	-0,04		0,10	-0,09	-0,34	-	0,04
SPAD	-0,38*	-0,29	-0,54*	0,21		0,24	-0,15	-	0,18
ASI	-0,14	0,46*	-0,26	-0,30	0,19		0,04	-	-0,47*
BR	-	-	-	-	-	-		-	-0,41*
BT	0,55*	-0,08	-0,20	0,37*	-0,22	-0,25	-		-
AK	-0,67*	0,14	0,01	-0,25	0,15	0,16	-	-0,37*	

$\Delta^{13}C_K$; Kohlenstoffisotopendiskriminierung in den Körnern, BLW; Anzahl Tage bis zur weiblichen Blüte, BLM; Anzahl Tage bis zur männlichen Blüte, WH; Wuchshöhe, SPAD; Chlorophyllgehalt des Kolbenblattes, ASI; Anthesis-Silking Intervall, BR; Blattrollen, BT; Temperatur des Kolbenblattes, AK; Anzahl Körner je Pflanze

Im Gegensatz zu der negativen Korrelation zwischen $\Delta^{13}C_K$ und der Anzahl Körner je Einzelpflanze ($r = -0,67$) in der Behandlung mit optimaler Wasserverfügbarkeit ergab sich unter suboptimaler Wasserverfügbarkeit eine signifikant positive Korrelation ($r = 0,40$) zwischen diesen beiden phänotypischen Merkmalen (Abbildung 16). Neben $\Delta^{13}C_K$ korrelierte auch das Anthesis-Silking Intervall (ASI) signifikant ($r = -0,47$) mit der Anzahl Körner je Parzelle in der Behandlung mit suboptimaler Wasserverfügbarkeit.

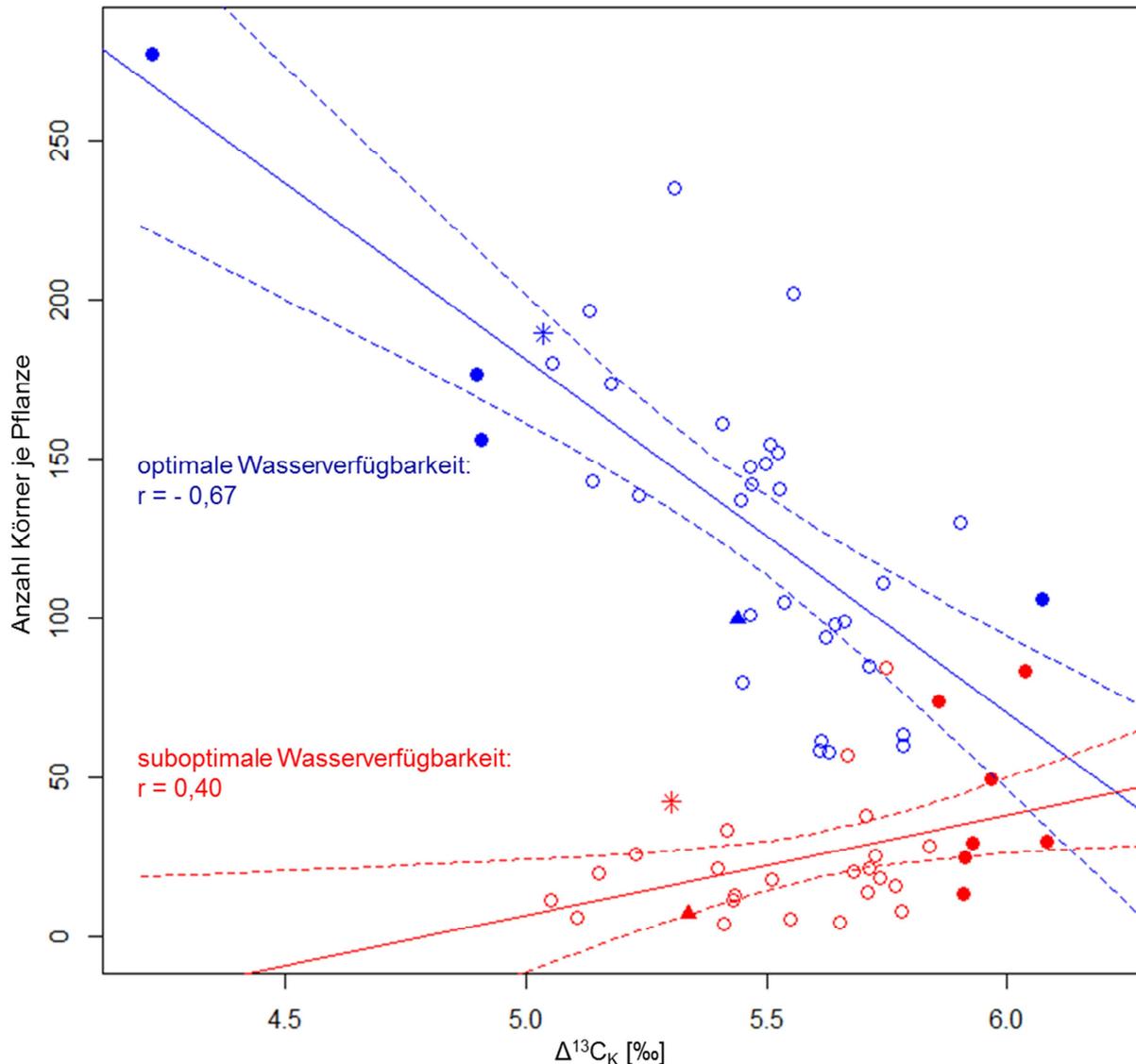


Abbildung 16 Statistischer linearer Zusammenhang zwischen der stabilen Kohlenstoffisotopendiskriminierung ($\Delta^{13}\text{C}_K$) und der Anzahl Körner je Pflanze unter optimaler (blau, GWH12_opt) und suboptimaler (rot, GWH12_sub) Wasserverfügbarkeit im Gewächshausversuch 2012 (GWH12). IL Linien, die sich in den jeweiligen Behandlungen als signifikant verschieden von IL-RE in $\Delta^{13}\text{C}_K$ zeigten sind als ausgefüllte Punkte, IL Linien, die sich nicht signifikant unterschieden sind als Kreise dargestellt. IL-RE wird durch die jeweiligen Dreiecke und IL-DE durch die Sterne symbolisiert. Die jeweiligen gestrichelten Kurven stellen die 95 % Konfidenzintervalle der Regressionsgerade dar.

Da kein signifikanter Zusammenhang zwischen $\Delta^{13}\text{C}_K$ und ASI bestand, beide Merkmale in der Behandlung mit suboptimaler Wasserverfügbarkeit jedoch signifikant mit AK korreliert waren, wurde überprüft, ob $\Delta^{13}\text{C}_K$ und ASI zusammen einen höheren Anteil der phänotypischen Varianz in AK unter suboptimaler Wasserverfügbarkeit erklären als jeweils getrennt. In der Behandlung mit suboptimaler Wasserverfügbarkeit ergab das Modell, das die phänotypische Varianz durch die Summe aus $\Delta^{13}\text{C}_K$ und ASI erklärt, eine signifikant bessere Modellanpassung als die

Modelle, welche jeweils AK nur in Abhängigkeit von einer der beiden Kovariablen darstellen (Tabelle 16).

Tabelle 16 Prozent der phänotypischen Varianz für Anzahl Körner je Pflanze (AK), erklärt durch die Kombination der stabilen Kohlenstoffisotopendiskriminierung ($\Delta^{13}\text{C}_K$) und das Anthesis-Silking Intervall (ASI) in der optimal und suboptimal bewässerten Behandlung des Gewächshausversuches 2012 (GWH12).

Modell	R^2_{adj}	
	optimale Wasserverfügbarkeit	suboptimale Wasserverfügbarkeit
$AK = \mu + \Delta^{13}\text{C}_K$	0,43	0,14
$AK = \mu + \text{ASI}$	0,00	0,20
$AK = \mu + \Delta^{13}\text{C}_K + \text{ASI}$	0,42	0,40

R^2_{adj} , um die Anzahl der Prädiktoren adjustiertes Bestimmtheitsmaß der Regression

3.5.3. Introgressionslinien mit signifikantem Effekt in $\Delta^{13}\text{C}$ unter kontrastierender Wasserverfügbarkeit

In der Behandlung mit optimaler Wasserverfügbarkeit bestätigten sich die Ergebnisse der vorangegangenen Versuche. Unter suboptimaler Wasserverfügbarkeit hatten die IL Linien, die sich signifikant von IL-RE unterscheiden, durchweg höhere $\Delta^{13}\text{C}_K$ Werte als IL-RE und es wurde eine Genomregion identifiziert, die unter suboptimaler Wasserverfügbarkeit mit $\Delta^{13}\text{C}_K$ assoziiert ist.

In der Behandlung mit optimaler Wasserverfügbarkeit bestätigten sich die Ergebnisse eines Großteils der IL Linien, welche auch im Feld bzw. GWH11 im Vergleich zu IL-RE signifikant höhere oder niedrigere $\Delta^{13}\text{C}_K$ Werte aufwiesen (Abbildung 17). So zeigten in der optimal bewässerten Variante des GWH12 die Linien IL-05 und IL-49 ein signifikant niedrigeres $\Delta^{13}\text{C}_K$, verglichen mit IL-RE. IL-80 und IL-81 zeigten dieselbe Tendenz wie im Feld und GWH11, waren jedoch bei einem globalen Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ nicht signifikant von IL-RE verschieden. Zwei weitere IL Linien, IL-11 und IL-25, hatten in der optimal bewässerten Variante des GWH12 ein signifikant niedrigeres bzw. höheres $\Delta^{13}\text{C}_K$ als IL-RE. Beide IL Linien waren sowohl im Feld als auch im GWH11 nicht signifikant verschieden in $\Delta^{13}\text{C}_K$, verglichen mit IL-RE. IL-11 zeigte jedoch im Feld und im GWH11 ebenfalls niedrigere $\Delta^{13}\text{C}_K$

Werte als IL-RE. IL-25 zeigte weder im Feld noch im GWH11 einen Hinweis auf einen Effekt in $\Delta^{13}\text{C}_K$. Für die IL Linie IL-70 ergab sich im Feld ein signifikant erhöhtes $\Delta^{13}\text{C}_K$. Dies konnte weder im GWH11 noch im GWH12 bestätigt werden.

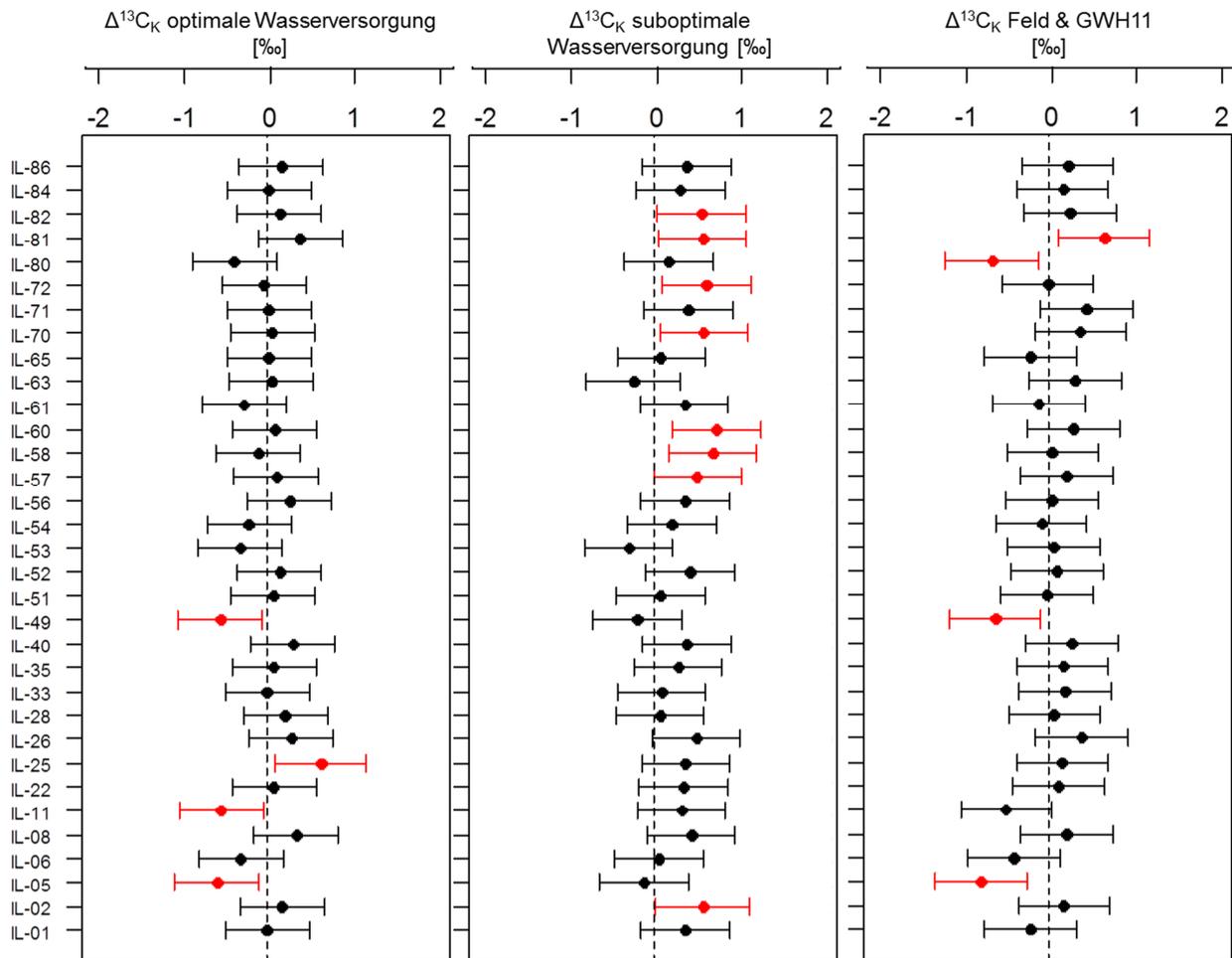


Abbildung 17 Phänotypische Werte der selektierten IL Linien für $\Delta^{13}\text{C}_K$ im Vergleich zum rekurrenten Elter (vertikal gestrichelte Linie) in der Gewächshausversuch 2012 (GWH12) Behandlung mit optimaler und suboptimaler Wasserverfügbarkeit, sowie über die Feld und Gewächshaus 2011 (GWH11) Versuche. Die horizontalen Linien stellen die jeweiligen Grenzen des 95 % Konfidenzintervalls basierend auf dem Dunnett Test dar. IL Linien, die sich signifikant ($\alpha = 0,05$) in $\Delta^{13}\text{C}_K$ von IL-RE unterscheiden sind in rot dargestellt.

Die ausgeprägte Genotyp-Behandlung Interaktion, welche die Varianzanalyse über beide Behandlungen hinweg zeigte, resultierte in einem deutlichen Unterschied in den IL Linien, die sich in einer der beiden Behandlungen signifikant von IL-RE unterschieden. In der Behandlung mit suboptimaler Wasserverfügbarkeit zeigten acht der 33 selektierten IL Linien signifikant höhere $\Delta^{13}\text{C}_K$ Werte als IL-RE. Keine der im GWH12 getesteten Linien zeigte unter suboptimaler Bewässerung signifikant geringere $\Delta^{13}\text{C}_K$ Werte als der rekurrente Elter. Die Tatsache, dass keine der 33 im

GWH12 getesteten IL Linien geringere $\Delta^{13}\text{C}_K$ Werte als IL-RE aufwies, war erstaunlich, insbesondere da sich die $\Delta^{13}\text{C}_K$ Werte von IL-RE und IL-DE in der suboptimalen Bewässerung nahezu identisch zeigten. Zudem hatte keine der 33 selektierten IL Linien, die sich in der optimal bewässerten Variante signifikant von IL-RE unterschieden, auch einen signifikanten Effekt unter suboptimaler Wasserverfügbarkeit.

Basierend auf den 33 selektierten IL Linien, wurden 92 Donorgenom-Zielregionen (ID_{33IL}) identifiziert. Die schrittweise Regression detektierte insgesamt 11 dieser 92 Zielregionen auf den Chromosomen 1, 2, 3, 6, 7, 8 und 10 mit signifikantem Einfluss auf $\Delta^{13}\text{C}_K$ in der optimal bewässerten Variante des GWH12 (Tabelle 17). Wie auch im Feld- bzw. GWH11-Versuch beobachtet, resultierten die Donorallele in diesen Zielregionen überwiegend in einer Reduktion von $\Delta^{13}\text{C}_K$. Der größte absolute Effekt auf $\Delta^{13}\text{C}_K$ war auf Chromosom 7 (-0,65 ‰, ID_{33IL} 68) zwischen 119,21 Mb und 157,47 Mb lokalisiert. Diese Donorgenomregion erklärte in einem Modell mit allen 11 Zielregionen als Prädiktorvariablen auch den größten Anteil an phänotypischer Variation (65 %). In den Versuchen im Feld und GWH11 war ebenfalls die Donorgenomregion auf Chromosom 7 (119,21 Mb bis 139,73 Mb) mit einem negativen Effekt auf $\Delta^{13}\text{C}_K$ assoziiert und erklärte auch in der Analyse über Feld und GWH11 den größten Anteil an phänotypischer Varianz. Vier weitere Donorgenomregionen, die in der Analyse über Feld und GWH11 detektiert wurden, bestätigten sich in der optimal bewässerten Variante des GWH12. So konnten im GWH12 die Regionen auf Chromosom 1 (ID_{33IL} 18), Chromosom 2 (ID_{33IL} 25) und Chromosom 6 (ID_{33IL} 53) mit jeweils negativem Effekt und die Region auf Chromosom 10 (ID_{33IL} 91) mit positivem Effekt auf $\Delta^{13}\text{C}_K$ bestätigt werden.

Obwohl in der optimal bewässerten Variante des GWH12 signifikante Korrelationen zwischen $\Delta^{13}\text{C}_K$, SPAD, BT und AK bestanden, wurden nur sehr wenige Zielregionen detektiert, die gleichzeitig $\Delta^{13}\text{C}_K$ und SPAD bzw. BT bzw. AK beeinflussten (Tabelle A 3). So zeigte die Zielregion auf Chromosom 6 (ID_{33IL} 53) einen positiven Effekt auf $\Delta^{13}\text{C}_K$ und gleichzeitig einen negativen auf SPAD. Diese Kolo-kalisation ergab sich zudem in der Analyse der Feld- und GWH11-Versuche.

Tabelle 17 Mit $\Delta^{13}\text{C}_K$ assoziierte Zielregionen basierend auf 33 unter optimaler Wasserverfügbarkeit im Gewächshausversuch 2012 (GWH12) getesteten IL Linien.

Zielregion ID _{33IL}	IL Linie ^a	Chr. ^b	Position der Zielregion ^c [Mb]		Länge der Zielregion [Mb]	ADD ^d [‰]	R _i ^{2e} [%]
			Anfang	Ende			
7		1	54,13	75,20	21,07	-0,12	3,00
18	IL-11	1	251,44	254,97	3,53	-0,19	9,00
25	IL-80	2	38,97	75,31	36,34	-0,18	5,00
29	IL-80	2	187,29	204,90	17,61	-0,23	9,00
36	IL-25	3	0,00	5,71	5,71	0,14	2,00
40	IL-25	3	191,48	203,56	12,08	0,13	3,00
53	IL-49	6	0,00	3,17	3,17	-0,32	11,00
61		6	161,96	167,44	5,48	0,10	2,00
68	IL-05	7	119,21	157,47	38,27	-0,65	46,00
80		8	166,31	174,25	7,94	-0,10	1,00
91	IL-81	10	135,71	139,20	3,49	0,11	3,00

^a IL Linien signifikant unterschiedlich zu IL-RE in $\Delta^{13}\text{C}_K$, die die jeweilige Zielregion tragen, ^b Chromosom, ^c geschätzte Grenzen der Zielregionen, ^d additiver Effekt der Donorallele der Zielregion in Relation zu IL-RE, ^e erklärte Prozent der beobachteten phänotypischen Varianz

Die negative Korrelation zwischen $\Delta^{13}\text{C}_K$ und AK in der Behandlung mit optimaler Wasserverfügbarkeit resultierte aus zwei Kolokalisationen von Zielregionen für diese beiden Merkmale. Auf Chromosom 2 zeigte eine Zielregion (ID_{33IL} 29) einen negativen Effekt auf $\Delta^{13}\text{C}_K$ und einen positiven Effekt auf AK. Im Gegensatz dazu zeigte eine weitere Zielregion auf Chromosom 6 (ID_{33IL} 61), die mit einem positiven Effekt auf $\Delta^{13}\text{C}_K$ assoziiert war, gleichzeitig einen negativen Effekt auf AK. Zwei weitere Zielregionen auf den Chromosomen 1 (ID_{33IL} 18) und 2 (ID_{33IL} 25) zeigten neben ihrem signifikanten Einfluss auf $\Delta^{13}\text{C}_K$ auch einen Einfluss auf BLW bzw. BLM. Keine der beiden Kolokalisationen wurde zuvor im Feld bzw. GWH11 detektiert.

In der suboptimal bewässerten Variante detektierte die schrittweise Regression eine Zielregion (ID_{33IL} 4,) auf Chromosom 1 (von 36,04 Mb bis 39,28 Mb) mit signifikantem Effekt auf $\Delta^{13}\text{C}_K$. Die Donorallele in dieser Zielregion erhöhten $\Delta^{13}\text{C}_K$ um 0,16 ‰ und erklärten 13 % der phänotypischen Variation. Diese Zielregion zeigte neben dem signifikanten Einfluss auf $\Delta^{13}\text{C}_K$ auch signifikante Assoziationen mit BLW, ASI und AK, wobei die Donorallele jeweils in einer früheren weiblichen Blüte (-1,70 Tage, R_i² = 17 %), einem verkürzten Anthesis-Silking Intervall (-1,40 Tage, R_i² = 20 %) und einer größeren Zahl an Körnern je Pflanze (13,14, R_i² = 0,12 %) resultierten. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus dem Dunnett Test (Abbildung 17) zeigten alle vier IL Linien, die diese Zielregionen trugen, höhere $\Delta^{13}\text{C}_K$ Werte als IL-RE. Die Differenzen in $\Delta^{13}\text{C}_K$ zwischen IL-RE und IL-58, IL-70 und IL-72 in $\Delta^{13}\text{C}_K$ waren dabei

signifikant. IL-71 zeigte mit $P = 0,27$ eine deutliche Tendenz zu höheren $\Delta^{13}\text{C}_K$ Werten als IL-RE.

4. Diskussion

Eine IL, entwickelt aus der Kreuzung einer Hartmais- und einer Zahnmaislinie, wurde unter optimaler Wasserverfügbarkeit sowohl im Gewächshaus als auch im Feld und unter suboptimaler Wasserverfügbarkeit im Gewächshaus hinsichtlich des Merkmals $\Delta^{13}\text{C}$ phänotypisiert. Die IL wurde mit dem Illumina MaizeSNP50 BeadChip hochauflösend genotypisiert. In allen getesteten Umwelten konnte eine signifikante genotypische Varianz für $\Delta^{13}\text{C}$ in Kornmaterial ($\Delta^{13}\text{C}_K$) detektiert und einzelnen Genombereichen zugeordnet werden. Merkmale der Pflanzenentwicklung beeinflussten $\Delta^{13}\text{C}_K$ nicht.

4.1. Variation des Merkmals $\Delta^{13}\text{C}$ in der C_4 Spezies Mais

Die Diskriminierung von stabilen Kohlenstoffisotopen wird in C_3 -Pflanzen aufgrund ihrer engen Korrelation mit der Transpirationseffizienz in physiologischen Studien als indirektes Merkmal für die WUE (u.a. Farquhar et al., 1982, Araus et al., 1998, Barbour et al., 2010) und in der Pflanzenzüchtung als Selektionsmerkmal für Sorten mit hoher WUE verwendet (Condon et al., 2002, Condon et al., 2004). Einen direkten Transfer der Ergebnisse aus C_3 - auf C_4 -Pflanzen ist wegen der Beteiligung von zusätzlichen Enzymen und der damit verbundenen CO_2 Vorfixierung während der C_4 -Photosynthese nicht möglich. Theoretische Überlegungen (Farquhar, 1983), gestützt durch erste experimentelle Ergebnisse (Hubick et al., 1990, Henderson et al., 1998), legen jedoch auch in C_4 -Pflanzen einen Zusammenhang von $\Delta^{13}\text{C}$ und der Transpiration nahe. Um $\Delta^{13}\text{C}$ in der C_4 Spezies Mais generell als Selektionsmerkmal für die WUE in Betracht zu ziehen, muss zunächst geklärt werden, ob ein Teil der phänotypisch beobachteten Variation in $\Delta^{13}\text{C}$ erblich ist, d.h. ob eine genotypische Variation für $\Delta^{13}\text{C}$ in Mais detektiert werden kann, inwieweit diese Variation von genotypischen Unterschieden in der Pflanzenentwicklung oder Pflanzenphysiologie abhängt, und welche Pflanzenteile am besten geeignet sind, genotypische Unterschiede in $\Delta^{13}\text{C}$ zu erfassen. Die Detektion von einzelnen Genomregionen mit Einfluss auf die Ausprägung von $\Delta^{13}\text{C}$ ermöglicht auch einen Einblick in die genetische Architektur und Komplexität des Merkmals $\Delta^{13}\text{C}$ in Mais.

4.1.1. Die Ausprägung von $\Delta^{13}\text{C}$ in der Mais Introgressionsbibliothek wird genetisch determiniert

Eine unbedingte Voraussetzung für jegliche züchterische Selektion ist die Existenz genotypischer Variation in den betreffenden Merkmalen und Populationen, da nur die erblichen Komponenten der phänotypischen Variation einen Selektionsgewinn ermöglichen (Fischbeck et al., 1985). Um festzustellen, ob eine genotypische Variation für $\Delta^{13}\text{C}$ in der C_4 Spezies Mais besteht, wurde $\Delta^{13}\text{C}$ in einer Mais IL unter diversen Umwelten mit optimaler und suboptimaler Wasserverfügbarkeit erfasst und hinsichtlich genotypischer Variation analysiert.

4.1.2. Genotypische Variation von $\Delta^{13}\text{C}$ unter optimaler Wasserverfügbarkeit

Die signifikante genotypische Variation sowie eine hohe Heritabilität von $\Delta^{13}\text{C}_K$ in der Mais IL zeigt, dass $\Delta^{13}\text{C}$ in der C_4 Spezies Mais, ähnlich wie in C_3 -Pflanzen, unter genetischer Kontrolle steht.

Nach dem Modell von Farquhar (1983) hängt die Variation von $\Delta^{13}\text{C}$ in C_4 -Pflanzen nicht nur von dem Verhältnis $c_i c_a^{-1}$ ab, sondern wird zusätzlich durch die *leakiness* beeinflusst. Als Konsequenz daraus kann davon ausgegangen werden, dass jegliche Variation in $c_i c_a^{-1}$ in C_4 -Pflanzen in einer deutlich kleineren Variation von $\Delta^{13}\text{C}$ resultiert als in C_3 -Pflanzen (Henderson et al., 1998). In Übereinstimmung mit diesem theoretischen Modell war das durchschnittliche $\Delta^{13}\text{C}_K$ in der IL in allen Versuchen deutlich niedriger als für C_3 -Pflanzen beschrieben (Vogel, 1980) und in einer ähnlichen Größenordnung wie in früheren Experimenten für Mais berichtet (Kubásek et al., 2007, Monneveux et al., 2007, Pengelly et al., 2011).

Obwohl sich die Wachstumsbedingungen zwischen Feld und Gewächshaus deutlich unterschieden, wurde in beiden Umwelten eine ähnliche Spannbreite an $\Delta^{13}\text{C}_K$ Werten beobachtet und die genotypische Variation für $\Delta^{13}\text{C}_K$ war sowohl im Feld als auch im Gewächshaus hochsignifikant. $\Delta^{13}\text{C}_K$ zeigte sich in der IL hoch heritabel. Verglichen mit dem rekurrenten Elter, verhielten sich die IL Linien in beiden Umwelten identisch, was auf ein hohes Maß an Reproduzierbarkeit der Ergebnisse

und gleichzeitig auf eine geringe Interaktion der Merkmalsausprägung mit Umwelteinflüssen hindeutet.

Die Ergebnisse bisheriger Studien hinsichtlich der intraspezifischen Variation in Mais sind uneinheitlich. O'Leary (1988) konnte keine signifikante genotypische Variation in einem diversen Set an 120 Maislinien nachweisen, wohingegen andere Untersuchungen signifikante genotypische Variation sowohl in Inzuchtlinien als auch in Hybriden fanden (Tieszen & Grant, 1990, Monneveux et al., 2007, Pengelly et al., 2011). Cabrera-Bosquet et al. (2009) fanden keine genotypische Variation für $\Delta^{13}\text{C}$ innerhalb von 16 verwandten Hybriden, eine unverwandte Hybridsorte hingegen zeigte signifikant unterschiedliche $\Delta^{13}\text{C}$ Werte, verglichen mit den 16 Hybriden im selben Experiment.

Eine Ursache für die gegensätzlichen Ergebnisse hinsichtlich der Signifikanz der genotypischen Variation von $\Delta^{13}\text{C}$ in Mais liegt möglicherweise in den jeweiligen spezifischen Eigenschaften des in den unterschiedlichen Experimenten verwendeten Pflanzenmaterials begründet. Cabrera-Bosquet et al. (2009) verwendeten Testkreuzungen von Inzuchtlinien, die aus der *La Posta Secuía* (CIMMYT) Population stammen. In dieser Population wurde bereits über mehrere Zyklen von rekurrenter Selektion auf verbesserte Trockenstresstoleranz selektiert (Pandey et al., 1986). Unter der Annahme, dass $\Delta^{13}\text{C}$ in C_4 -Pflanzen zumindest teilweise von $c_i c_a^{-1}$ (Farquhar, 1983) und somit von der Transpirationseffizienz (Henderson et al., 1998) beeinflusst wird, erscheint es wahrscheinlich, dass die Selektion auf höhere Erträge unter Wassermangel in der *La Posta Secuía* Population gleichzeitig zu einer Anreicherung an positiven Allelen für $\Delta^{13}\text{C}$ führte und somit möglicherweise in einer Reduktion, oder sogar dem Fehlen von genotypischer Variation für $\Delta^{13}\text{C}$ innerhalb dieses Pflanzenmaterials resultierte.

4.1.3. Genotypische Variation von $\Delta^{13}\text{C}$ unter reduzierter Wasserverfügbarkeit

Die Ausprägung von $\Delta^{13}\text{C}_K$ in der IL ist über diverse Umwelten mit optimaler Wasserverfügbarkeit äußerst stabil, Wassermangel provoziert jedoch eine deutliche Änderung der phänotypischen Ausprägung.

Im GWH12 Versuch wurden 33 selektierte IL Linien sowohl unter optimaler Wasserverfügbarkeit, in ähnlicher Weise wie bereits im GWH11 Versuch und unter

suboptimaler Wasserverfügbarkeit auf $\Delta^{13}\text{C}_K$ getestet. Die Selektion der 33 IL Linien erfolgte unter Berücksichtigung der Ergebnisse aus den Feld- und GWH11-Versuchen, sodass die IL Linien, die in den vorangegangenen Versuchen die höchsten bzw. niedrigsten $\Delta^{13}\text{C}_K$ Werte zeigten, im GWH12 getestet wurden. Wie erwartet, bestätigte sich der bereits diskutierte Effekt der höheren $\Delta^{13}\text{C}_K$ Werte unter Gewächshaus- verglichen mit Feldbedingungen. Die Spannbreite der $\Delta^{13}\text{C}_K$ Werte in der Behandlung mit optimaler Wasserverfügbarkeit entsprach den Ergebnissen aus den vorangegangenen Versuchen. Die signifikante genotypische Variation und hohe Wiederholbarkeit von $\Delta^{13}\text{C}_K$ unter optimaler Wasserverfügbarkeit konnte bestätigt werden.

Unter den Bedingungen mit suboptimaler Wasserverfügbarkeit wurde im Mittel über alle 33 IL Linien, verglichen mit der optimal bewässerten Behandlung, ein Ansteigen der $\Delta^{13}\text{C}_K$ Werte beobachtet. Dies bedeutet, dass die 33 IL Linien in GWH12_sub im Mittel einen kleineren Anteil an ^{13}C Atomen aufwiesen als in GWH12_opt. Diese Reaktion von $\Delta^{13}\text{C}$ in Folge von Wasserknappheit wurde bereits von Dercon et al. (2006), Monneveux et al. (2007) und Cabrera-Bosquet et al. (2009) für Mais und von Henderson et al. (1998), Brück et al. (2000), Williams et al. (2001) für die C_4 Kulturarten Sorghum und Perlhirse beschrieben. Im Gegensatz dazu wurden in den C_3 -Pflanzen Gerste und Weizen unter Trockenstress niedrigere $\Delta^{13}\text{C}$ Werte als unter optimaler Wasserverfügbarkeit beschrieben, und als Folge einer geringeren stomatären Leitfähigkeit unter Trockenstress diskutiert (Farquhar & Richards, 1984, Sánchez-Díaz et al., 2002, Araus et al., 2003, Wu et al., 2011). Das Ansteigen von $\Delta^{13}\text{C}_K$ in Folge von suboptimaler Wasserverfügbarkeit kann bei C_4 -Pflanzen einerseits aus einem kleineren $c_i c_a^{-1}$, bei einer *leakiness* unter 0,34 oder aus einer Erhöhung der *leakiness* über 0,34 resultieren (Abbildung 1). Eine Reduktion von $c_i c_a^{-1}$ kann dabei einerseits die Folge einer verstärkten CO_2 Assimilationsrate oder einer reduzierten stomatären Leitfähigkeit sein. Eine verstärkte CO_2 Assimilationsrate unter suboptimaler Wasserverfügbarkeit erscheint unwahrscheinlich (Crafts-Brandner & Salvucci, 2002), weshalb eine Reduktion von $c_i c_a^{-1}$ durch eine reduzierte stomatäre Leitfähigkeit bedingt sein müsste. Die tatsächliche stomatäre Leitfähigkeit wurde im GWH12 Versuch nicht erfasst. Jedoch wurde die Blatttemperatur gemessen und zeigte im Mittel über die 33 IL Linien signifikant höhere Blatttemperaturen in der Behandlung mit suboptimaler Wasserverfügbarkeit, verglichen mit der optimal bewässerten Behandlung. Insbesondere unter suboptimaler Wasserverfügbarkeit

besteht eine starke negative Korrelation zwischen der Blatttemperatur und der stomatären Leitfähigkeit (u.a. Kümmerlen et al., 1999, Liu et al., 2011, Dalil & Ghassemi-Golezani, 2012), sodass im Mittel von einer geringeren stomatären Leitfähigkeit der 33 IL Linien in GWH12_sub als in GWH12_opt ausgegangen werden kann und somit im Mittel über alle 33 IL Linien auch ein geringeres $c_i c_a^{-1}$ in GWH12_sub als in GWH12_opt wahrscheinlich ist. Ein Ansteigen von $\Delta^{13}C_K$ in GWH12_sub in Folge einer Erhöhung der *leakiness* erscheint eher unwahrscheinlich. Zwar berichten Kubásek et al. (2007) eine Temperaturabhängigkeit der *leakiness* in Mais aufgrund der unterschiedlichen Wirkungsoptima der PEPC bzw. RuBisCO, diesen Beobachtungen folgend wäre aber unter den gemessenen Temperaturen im GWH12_sub eine Reduktion der *leakiness* gegenüber GWH12_opt zu erwarten. Zudem ermittelten Henderson et al. (1992) durch die gleichzeitige Messung von $\Delta^{13}C$ und der Gaswechselrate eine relativ stabile *leakiness* zwischen 0,2 und 0,3 über mehrere C_4 Spezies und unter verschiedenen Umweltbedingungen (u.a. Blatttemperatur).

In GWH12 wurden neben den 33 IL Linien auch beide Eltern der IL Population getestet. In der Behandlung mit optimaler Bewässerung entsprach $\Delta^{13}C_K$ des rekurrentem Elters annähernd dem mittlerem $\Delta^{13}C_K$ der 33 IL Linien. Dies war zu erwarten, da $\Delta^{13}C_K$ von IL-RE bereits im Feld bzw. GWH11 annähernd dem Mittel über alle 77 IL Linien entsprach, und die Selektion der 33 IL Linien entsprechend den Ergebnissen aus Feld und GWH11 erfolgte. In der Behandlung mit suboptimaler Wasserverfügbarkeit ergab sich jedoch im Mittel über die 33 IL Linien ein höheres $\Delta^{13}C_K$ als für beide Eltern. Dies war unerwartet, könnte aber darin begründet sein, dass die Selektion der 33 IL Linien ausschließlich auf den Ergebnissen der Versuche unter optimaler Wasserverfügbarkeit basierte und somit einige IL Linien, die ein niedrigeres $\Delta^{13}C_K$ unter suboptimaler Wasserverfügbarkeit aufgewiesen hätten, nicht in der Selektion berücksichtigt wurden. Dieser Einfluss der Selektion könnte auch die geringere genotypische Variation in $\Delta^{13}C_K$ unter suboptimaler Wasserverfügbarkeit in GWH12_sub, verglichen mit GWH12_opt, erklären. Es bleibt daher offen, inwieweit ein Rückgang der genotypischer Variation in $\Delta^{13}C_K$ unter suboptimaler Wasserversorgung auch für das im GWH11 getestete Set von 77 IL Linien beobachtet worden wäre. Sowohl Monneveux et al. (2007) als auch Cabrera-Bosquet et al. (2009) berichten von einer höheren Variation in $\Delta^{13}C_K$ mit Zunahme des Wassermangels in Mais, und auch die C_3 Kulturarten Gerste und Weizen zeigten

höhere genotypische Variationen in $\Delta^{13}\text{C}$ unter Trockenstress als unter optimal bewässerten Bedingungen (Teulat et al., 2002, Wu et al., 2011). Obwohl möglicherweise einige IL Linien, die zur Variation in $\Delta^{13}\text{C}_K$ unter suboptimaler Wasserversorgung beigetragen hätten, nicht in der Selektion der getesteten 33 IL Linien enthalten waren, konnte, wie zuvor schon in den Versuchen mit optimaler Wasserverfügbarkeit, auch in GWH12_sub eine hoch signifikante genotypische Varianz für $\Delta^{13}\text{C}_K$ detektiert werden. Dies stellt ein starkes Indiz dafür dar, dass die stabile Kohlenstoffisotopendiskriminierung auch in der C_4 Spezies Mais maßgeblich vom Genotyp bedingt wird.

Über GWH12_opt und GWH12_sub wurde eine hoch signifikante Genotyp-Behandlung Interaktion detektiert. Über die Feld und GWH11 Versuche wurde keine signifikante Genotyp-Umwelt Interaktion für $\Delta^{13}\text{C}_K$ festgestellt, und $\Delta^{13}\text{C}_K$ hatte sich über diese beiden sehr unterschiedlichen Umwelten, die sich deutlich hinsichtlich Luftfeuchtigkeit, Temperatur und Einstrahlung unterschieden, als äußerst stabil erwiesen. Ähnliche Ergebnisse wurden für $\Delta^{13}\text{C}$ in C_3 -Pflanzen berichtet. So zeigte $\Delta^{13}\text{C}$ in einer F_2 -Kartierungspopulation von Hartweizen (*Triticum turgidum* spp. *durum* Desf.) über mehrere Jahre unter optimal bewässerten Bedingungen evaluiert, keine signifikante Genotyp-Umwelt Interaktion (Panio et al., 2013). Merah et al. (2001) hingegen fanden eine deutliche Genotyp-Umwelt Interaktion in einem diversen Set von Hartweizenakzessionen über mehrere Umwelten mit variabler Wasserverfügbarkeit. In Gerste bestätigte sich die Stabilität von $\Delta^{13}\text{C}$ über Feldversuche mit optimaler Wasserversorgung. Unter Einbeziehung von Versuchen mit suboptimaler Wasserversorgung konnte jedoch eine signifikante Genotyp-Umwelt Interaktion festgestellt werden (Chen et al., 2012). Die hohe Stabilität der $\Delta^{13}\text{C}_K$ Expression über diverse Umwelten mit optimaler Wasserverfügbarkeit bestätigt sich auch auf der Ebene der einzelnen IL Linien. Von den fünf im Feld bzw. GWH11 identifizierten IL Linien, die sich signifikant von IL-RE in $\Delta^{13}\text{C}_K$ unterschieden, zeigten zwei IL Linien im GWH12_opt dieselben signifikanten Unterschiede zu IL-RE und nahezu alle verbleibenden IL Linien ergaben, obwohl nicht signifikant, im GWH12_opt doch dieselben Tendenzen in Relation zu IL-RE, wie zuvor im Feld bzw. GWH11 beobachtet. Hingegen stimmte, mit Ausnahme von IL-81, das Verhalten keiner der 33 im GWH12 getesteten IL Linien bezüglich $\Delta^{13}\text{C}_K$ relativ zu IL-RE über die Behandlung überein. Das Auftreten der Genotyp-Behandlung Interaktion in GWH12 mit kontrastierender Wasserverfügbarkeit sowie die sehr geringe

Übereinstimmung der IL Linienleistung in Relation zu IL-RE zwischen den beiden Behandlungen verdeutlicht, dass auch in C₄-Pflanzen, wie bereits für C₃-Pflanzen beschrieben, die den Pflanzen zur Verfügung stehende Wassermenge eine vorrangige Bedeutung in der Ausprägung von $\Delta^{13}\text{C}_K$ hat.

4.1.4. Die Variation von $\Delta^{13}\text{C}$ in Blättern und Körnern

Die Analyse von $\Delta^{13}\text{C}$ in Körnern und $\Delta^{13}\text{C}$ in Blättern ergibt konsistente Ergebnisse in der Mais IL.

Im GWH11 Versuch wurde die stabile Isotopendiskriminierung sowohl in den Körnern als auch in den Blättern erfasst. Dies ermöglicht einen Vergleich der Eignung dieser beiden Pflanzenorgane für die Analyse von $\Delta^{13}\text{C}$ in der C₄ Spezies Mais. Im Mittel über die 77 IL Linien zeigte $\Delta^{13}\text{C}$ in den Blättern ($\Delta^{13}\text{C}_B$) höhere Werte als $\Delta^{13}\text{C}_K$. Diese Differenz erwies sich jedoch aufgrund des erheblichen Restfehlers, der sich für $\Delta^{13}\text{C}_B$ ergab, als nicht signifikant. Höhere $\Delta^{13}\text{C}$ Werte im vegetativen als im generativen Gewebe wurden zuvor bereits in C₄ Spezies (Henderson et al., 1992, Monneveux et al., 2007, Cabrera-Bosquet et al., 2009) und in C₃ Spezies (u.a. Craufurd et al., 1991, Condon & Richards, 1992, Merah et al., 2001) beschrieben und unterstützen somit die Tendenz der höheren $\Delta^{13}\text{C}$ Werte im Blattmaterial in der Mais IL. Mögliche Ursachen für die unterschiedlichen $\Delta^{13}\text{C}$ Werte in vegetativen und generativen Geweben könnten u.a. durch Unterschiede in $\Delta^{13}\text{C}$ während des Lebenszyklus einer Pflanze (Monneveux et al., 2005) oder in Unterschieden in der chemischen Zusammensetzung von Korn und Blatt begründet sein (Collister et al., 1994, Badeck et al., 2005, Cernusak et al., 2009). Auch könnte δ_i unter den Bedingungen eines Gewächshauses mit eingeschränktem Austausch von Gewächshaus-CO₂ und atmosphärischem-CO₂ größeren oder zeitlich kurzfristigeren Schwankungen unterliegen als angenommen. Kurzfristige, in der Schätzung von $\Delta^{13}\text{C}$ nicht berücksichtigte Schwankungen in δ_i , würden sich direkt auf $\Delta^{13}\text{C}_B$ auswirken, hätten jedoch wahrscheinlich einen geringeren Einfluss auf $\Delta^{13}\text{C}_K$. Scartazza et al. (1998) berichten, dass $\Delta^{13}\text{C}$, gemessen in Pflanzenmaterial, die photosynthetische Kohlenstoffisotopendiskriminierung über den gesamten Zeitraum, in dem dieses Pflanzenmaterial produziert wurde, integriert. Da in Mais davon ausgegangen werden kann, dass mehr als 20 % des in den Körnern eingelagerten

Kohlenstoffs nicht direkt aus der aktuell ablaufenden Photosynthese, sondern aus der Umlagerung aus in anderen Organen gespeichertem Kohlenstoff stammt (Ruget, 1993), integriert $\Delta^{13}\text{C}_K$ wahrscheinlich über einen längeren Zeitraum als $\Delta^{13}\text{C}_B$ und ist damit weniger anfällig gegenüber kurzfristigen Schwankungen in der Diskriminierung oder δ_l .

In der Mais IL zeigte sich, wie auch zuvor für $\Delta^{13}\text{C}_K$, eine signifikante genotypische Variation für $\Delta^{13}\text{C}_B$. Durch den höheren Restfehler von $\Delta^{13}\text{C}_B$ war die Wiederholbarkeit von $\Delta^{13}\text{C}_B$ jedoch geringer als für $\Delta^{13}\text{C}_K$. Dies änderte sich auch unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Anzahl an Beobachtungen, drei Wiederholungen je Genotyp für $\Delta^{13}\text{C}_B$ bzw. sechs Wiederholungen je Genotyp für $\Delta^{13}\text{C}_K$, nicht. Die positive Korrelation zwischen $\Delta^{13}\text{C}_K$ und $\Delta^{13}\text{C}_B$ war, obwohl signifikant, schwach ($r = 0,31$). Die einzelnen IL Linien zeigten jedoch die gleichen Tendenzen in $\Delta^{13}\text{C}_B$ in Bezug auf IL-RE wie für $\Delta^{13}\text{C}_K$ beobachtet (Abbildung A 3 im Anhang), weshalb davon auszugehen ist, dass zumindest in der untersuchten IL $\Delta^{13}\text{C}_K$ und $\Delta^{13}\text{C}_B$ annähernd die gleichen Aussagen hinsichtlich der genotypischen Variation und den Effekten der einzelnen IL Linien zulassen. Aufgrund der höheren Heritabilität von $\Delta^{13}\text{C}_K$ gegenüber $\Delta^{13}\text{C}_B$ im GWH11 wurde $\Delta^{13}\text{C}$ in den übrigen Versuchen der vorliegenden Arbeit vorwiegend in Körnern gemessen. Die höheren Heritabilitäten von $\Delta^{13}\text{C}_K$, verglichen mit $\Delta^{13}\text{C}_B$, wurden auch von Cabrera-Bosquet et al. (2009) berichtet und könnten darauf hinweisen, dass $\Delta^{13}\text{C}_K$ somit geeigneter ist, genetische Unterschiede in $\Delta^{13}\text{C}$ zu erfassen als $\Delta^{13}\text{C}_B$. Die Erfassung von $\Delta^{13}\text{C}_B$ wäre der Erfassung von $\Delta^{13}\text{C}_K$ vorzuziehen, falls $\Delta^{13}\text{C}$ als indirektes Selektionsmerkmal in der praktischen Pflanzenzüchtung Anwendung finden sollte, da die Selektion von erwünschten Genotypen bereits vor der Ernte erfolgen könnte. Daher werden zusätzliche Untersuchungen, ähnlich denen in C_3 -Pflanzen (z.B. Craufurd et al., 1991, Condon & Richards, 1992, Kirda et al., 1992, Brandes et al., 2006), zur Korrelation zwischen $\Delta^{13}\text{C}_K$ und $\Delta^{13}\text{C}_B$ benötigt, um diese Zusammenhänge im Detail untersuchen zu können.

4.1.5. Genomregionen, die mit $\Delta^{13}\text{C}$ in der Mais Introgressionsbibliothek assoziiert sind

Die große Zahl an Zielregionen, die in der IL mit $\Delta^{13}\text{C}_K$ unter optimaler Wasserverfügbarkeit assoziiert ist, deutet auf eine polygene Regulierung der $\Delta^{13}\text{C}_K$ Ausprägung und auf die Beteiligung mehrerer physiologischer Prozesse hin.

Aus der Literatur sind keine genomischen Regionen, die eine Variation in $\Delta^{13}\text{C}$ in Mais bedingen, bekannt. Ergebnisse aus C_3 Kulturarten deuten jedoch darauf hin, dass $\Delta^{13}\text{C}$ unter polygener Kontrolle steht, also von einer Vielzahl unabhängig vererbter Loci mit relativ kleinem Beitrag zur phänotypischen Ausprägung bedingt wird (Chen et al., 2011). Ebenso verhält es sich wahrscheinlich in der C_4 Spezies Mais. Von 22 über Feld und GWH11 detektierten Zielregionen, die im Zusammenhang mit $\Delta^{13}\text{C}_K$ stehen, erklärte nur eine Zielregion auf Chromosom 7 (ID_{77IL} 117) mehr als 10 % der phänotypischen Varianz. Dem Modell von Farquhar (1983) folgend, wird $\Delta^{13}\text{C}$ von der CO_2 Diffusionsgeschwindigkeit in den Blättern, der Photosynthesekapazität und der *leakiness* beeinflusst. Zumindest für die stomatäre Leitfähigkeit und die Photosynthesekapazität ist bereits bekannt, dass sie u.a. in Mais unter polygener Kontrolle stehen (Sanguineti et al., 1999, Ming et al., 2006). Diese Tatsache könnte zumindest teilweise die relativ große Anzahl an Genomregionen, die $\Delta^{13}\text{C}_K$ in der IL beeinflussen, erklären.

In einem Modell mit allen 22 Zielregionen als Prädiktorvariablen erklärte das Modell 85,5 % der phänotypischen Varianz. Mit einer aus den Mittelwerten der Prüfglieder geschätzten Heritabilität von fast 69 % würde das bedeuten, dass nahezu 100 % der in der IL vorhandenen genotypischen Varianz für das Merkmal $\Delta^{13}\text{C}_K$ durch das Modell der 22 Zielregionen erklärt wird. Da die Anzahl der möglichen Prädiktoren, also alle möglichen Zielregionen, deutlich größer ist als die Anzahl an phänotypischen Beobachtungen und das Modell zudem noch substantielle Kollinearität zwischen den Prädiktoren aufweist, muss davon ausgegangen werden, dass einige der identifizierten Zielregionen falsch Positive darstellen und die einzelnen Effekte der Zielregionen auf die $\Delta^{13}\text{C}_K$ Ausprägung überschätzt sind. Beide Hypothesen, sowohl die der polygenen Regulation der $\Delta^{13}\text{C}_K$ Ausprägung als auch die der überschätzten Effekte der identifizierten Genomregionen auf $\Delta^{13}\text{C}_K$, werden durch die Ergebnisse aus GHW12_opt unterstützt. So bestätigten sich von den unter Feld bzw. GWH11 identifizierten 22 Genomregionen fünf in GHW12_opt und dabei

vorrangig die, die bereits die größten Effekte auf $\Delta^{13}\text{C}_K$ über Feld und GWH11 zeigten. Dies ist als Indiz für die polygene Vererbung von $\Delta^{13}\text{C}_K$ in der Mais IL zu werten und bekräftigt die Hypothese, dass diesen Effekten tatsächlich Gene oder kausale genomische Strukturen zugrunde liegen, die die Ausprägung von $\Delta^{13}\text{C}_K$ determinieren.

Gleichzeitig konnte jedoch der Effekt der verbleibenden 18 Genomregionen nicht durch die Daten aus GWH12_opt bestätigt werden. Dies wird größtenteils an der reduzierten Zahl an getesteten IL Linien und der sich daraus ergebenden geringeren Auflösung der Genomregionen liegen, könnte aber auch auf den Umfang der falsch Positiven hindeuten. In GWH12_opt war das Verhältnis von phänotypischen Beobachtungen zu möglichen Prädiktoren ungünstiger als über Feld und GWH11 ($33 \cdot 92^{-1}$ in GWH12_opt und $77 \cdot 164^{-1}$ über Feld und GWH11), und die Kollinearität der 92 Zielregionen in GWH12 war zudem deutlich ausgeprägter als über die 164 Zielregionen im Feld bzw. GWH11. Die deutlich größeren Effekte der in GWH12_opt identifizierten Genomregionen, im Vergleich zu den über Feld und GWH11 detektierten Effekten, deuten ebenfalls auf eine mögliche Überschätzung der Effekte hin. Eine Kreuzvalidierung für die Kontrolle der falsch Positiven und die Korrektur der Effekte, wie sie in QTL Analysen mit spaltenden Populationen empfohlen wird (Utz et al., 2000), ist in einer IL aufgrund der spezifischen genetischen Struktur, in der an vielen Loci die Donorallele nur von einer IL Linie repräsentiert werden, nicht möglich. Aus diesem Grund muss die finale Validierung aller in dieser Arbeit detektierten Genomregionen mit signifikantem Einfluss auf $\Delta^{13}\text{C}_K$ an unabhängigem Pflanzenmaterial erfolgen.

Dennoch bleibt festzustellen, dass in der IL zwei Genomregionen jeweils auf den Chromosomen 6 und 7 (ID_{77IL} 94 und 117 bzw. ID_{33IL} 53 und 68) über unabhängige Versuche mit absoluten additiven Effekten über 0,25 ‰ assoziiert sind und alle IL Linien, die Donorallele in diesen Genomregionen aufwiesen, über alle Versuche geringere $\Delta^{13}\text{C}_K$ Werte als der rekurrente Elter zeigten. In Tomate konnten Xu et al. (2008) erfolgreich einen QTL für die Kohlenstoffisotopendiskriminierung auf Chromosom 5 mit einem additiven Effekt von 0,22 ‰ feinkartieren. In Arabidopsis identifizierten Masle et al. (2005) einen QTL für $\Delta^{13}\text{C}$ in einer Population von rekombinanten Inzuchtlinien aus einer Kreuzung einer Col-4 und einer Ler Akzession auf Chromosom 2. Dieser QTL war abhängig von den Umweltbedingungen mit einem additiven Effekt zwischen 0,19 ‰ und 0,29 ‰ gekoppelt, und *ERECTA*, ein Gen, für

das bereits zuvor bekannt war, dass es die stomatäre Leitfähigkeit, die Expansion der Epidermiszellen und die Ausbreitung der Mesophyllzellen beeinflusst, wurde als das dem QTL zu Grunde liegende Gen identifiziert. Unter Berücksichtigung der relativ großen Effekte auf $\Delta^{13}\text{C}_\text{K}$, die unter optimaler Wasserverfügbarkeit mit den beiden Zielregionen auf den Chromosomen 6 und 7 in der IL assoziiert sind, sowie der Telomer-nahen Lage dieser beiden Zielregionen, erscheint eine Feinkartierung dieser beiden Effekte somit als vielversprechend.

Unter suboptimaler Wasserverfügbarkeit konnte eine Genomregion auf Chromosom 1 mit signifikantem Einfluss auf $\Delta^{13}\text{C}_\text{K}$ identifiziert werden. Es ist wahrscheinlich, dass einige weitere Genomregionen die $\Delta^{13}\text{C}_\text{K}$ in der IL unter suboptimaler Wasserverfügbarkeit beeinflussen unentdeckt blieben. Für deren Identifikation sind weitere Versuche notwendig.

Im Gegensatz zu der großen Anzahl an Genomregionen, die einen signifikanten Zusammenhang zu $\Delta^{13}\text{C}_\text{K}$ unter optimaler Wasserverfügbarkeit zeigten, konnte nur eine Genomregion auf Chromosom 1 identifiziert werden, die einen signifikanten Einfluss auf die $\Delta^{13}\text{C}_\text{K}$ Ausprägung in GWH12_sub unter suboptimaler Wasserverfügbarkeit zeigte. Dies war unerwartet, da nahezu ein Viertel der 33 unter suboptimaler Wasserverfügbarkeit getesteten IL Linien sich signifikant in $\Delta^{13}\text{C}_\text{K}$ von IL-RE unterschieden und die Effekte der IL Linien in GWH12_sub eine ähnliche Größenordnung wie in GWH12_opt aufwiesen. Alle IL Linien, die sich signifikant von IL-RE in $\Delta^{13}\text{C}_\text{K}$ unterschieden, zeigten höhere $\Delta^{13}\text{C}_\text{K}$ Werte als IL-RE. Entsprechend resultierten die Allele des Donor-Elters in der identifizierten Genomregion auf Chromosom 1 in einem höheren $\Delta^{13}\text{C}_\text{K}$, wobei jedoch nicht alle IL Linien mit höherem $\Delta^{13}\text{C}_\text{K}$ die Allele des Donor-Elters in dieser Genomregion aufwiesen. Es ist somit äußerst wahrscheinlich, dass weitere Genomregionen, welche die Ausprägung von $\Delta^{13}\text{C}_\text{K}$ in der IL unter suboptimaler Wasserverfügbarkeit beeinflussen, nicht detektiert wurden. Eine mögliche Erklärung für die geringe Anzahl an detektierten Genomregionen, neben der geringeren Wiederholbarkeit von $\Delta^{13}\text{C}_\text{K}$ in GWH12_sub verglichen mit GWH12_opt, ist, dass mit den selektierten 33 IL Linien ca. 25 % des Donorgenoms nicht abgedeckt waren und somit in diesem Teil des Donorgenoms keine Genomregionen mit Einfluss auf $\Delta^{13}\text{C}_\text{K}$ detektiert werden konnten. Dies würde auch die bereits diskutierte Diskrepanz zwischen der Leistung der beiden Eltern der IL in $\Delta^{13}\text{C}_\text{K}$, verglichen mit der durchschnittlichen Leistung der 33 selektierten IL

Linien, erklären. Eine weitere Ursache für die geringere Anzahl an in GWH12_sub identifizierten Genomregionen könnte sein, dass vermehrt Effekte in Repulsion, also Gene mit positiven und Gene mit negativen Effekten auf $\Delta^{13}\text{C}_K$ innerhalb eines Donorgenomfragments, auftraten. Wie bereits diskutiert, basierte die Selektion der 33 IL Linien u.a. auf der Voraussetzung eine möglichst vollständige Genomabdeckung zu ermöglichen. Dies hatte zur Folge, dass die IL Linien, die aufgrund ihrer Genomabdeckung selektiert wurden, jeweils überdurchschnittlich große Donorgenomfragmente trugen. Mit Zunahme der Größe der Donorgenomfragmente steigt auch die Wahrscheinlichkeit, dass Effekte in Repulsion auftreten und sich deren gegensätzliche Effekte nahezu aufheben. Basierend auf 77 IL Linien in Feld und GWH11 konnten gegensätzliche allelische Effekte auf $\Delta^{13}\text{C}_K$ in direkter Nachbarschaft auf den Chromosomen 1, 2, 3, 9 und 10 identifiziert werden (ID_{77IL} 15/21, 39/41, 62/63, 150/151, 155/158). Das Auftreten von eng benachbarten Genomregionen mit gegensätzlichen Effekten auf $\Delta^{13}\text{C}$ wurde auch in der C₃ Kulturart Reis (Takai et al., 2009) beobachtet. Im Gegensatz dazu wurden in GWH12_opt, basierend auf 33 IL Linien, zwar die Genomregionen mit den größten Effekten auf $\Delta^{13}\text{C}_K$ detektiert, die unter Feld und GWH11 gefundenen, eng benachbarten gegensätzlichen Effekte konnten jedoch nicht detektiert werden. So ist es wahrscheinlich, dass, in ähnlicher Weise, auch in GWH12_sub einige Genomregionen mit Einfluss auf die Ausprägung von $\Delta^{13}\text{C}_K$ unter suboptimaler Wasserverfügbarkeit unentdeckt blieben.

Die Ergebnisse aus GWH12_sub stellen einen ersten Schritt in der Detektion von Genomregionen für $\Delta^{13}\text{C}_K$ unter suboptimaler Wasserverfügbarkeit dar. Da die Untersuchungen an einer begrenzten Anzahl an selektierten IL Linien durchgeführt wurden und auf einer einzigen, artifiziellen Umwelt beruhen, bedarf es weiterer Versuche, insbesondere mit allen IL Linien und möglicherweise im Freiland, um die in der vorliegenden Studie erarbeiteten Erkenntnisse zur genetischen Struktur von $\Delta^{13}\text{C}_K$ unter suboptimaler Wasserverfügbarkeit zu überprüfen und zu ergänzen.

4.1.6. Assoziation der $\Delta^{13}\text{C}$ Ausprägung mit Merkmalen der Pflanzenentwicklung und Pflanzenphysiologie

Die Ausprägung von $\Delta^{13}\text{C}_K$ in der Mais IL ist unter optimaler wie auch unter suboptimaler Wasserverfügbarkeit weitgehend unabhängig von genotypischen Unterschieden in der Pflanzenentwicklung.

Die Eltern der IL entstammen dem europäischen Hartmais (Donor-Elter) und dem europäischen Zahnmais Genpool (rekurrenter Elter). Die aus diesen sehr unterschiedlichen Genotypen entwickelte IL zeigte daher, wie erwartet in allen Versuchen signifikante genotypische Variation für alle erfassten Merkmale der Pflanzenentwicklung, ausgenommen SenL. Dennoch wurden über Feld und GWH11 sowie über GWH12_opt und GWH12_sub weder eine signifikante phänotypische noch eine signifikante genotypische Korrelation zwischen $\Delta^{13}\text{C}_K$ und einem der erfassten Merkmale der Pflanzenentwicklung detektiert. Dies war insofern unerwartet, als in vielen C_3 Spezies starke phänotypische und genotypische Korrelationen zwischen $\Delta^{13}\text{C}$ und der Phänologie, wie auch Kollokationen von QTL für $\Delta^{13}\text{C}$ und Merkmalen der Pflanzenentwicklung, insbesondere des Blühzeitpunktes und der physiologischen Reife, beschrieben wurden (Craufurd et al., 1991, Ehdai et al., 1991, Ellis et al., 2002, Teulat et al., 2002, McKay et al., 2003, Hausmann et al., 2005, Juenger et al., 2005, Rebetzke et al., 2008, Hall et al., 2010, Wu et al., 2011).

Eine mögliche Ursache für die Unabhängigkeit von $\Delta^{13}\text{C}_K$ und den Merkmalen der Pflanzenentwicklung in der Mais IL könnte in ihrer spezifischen genetischen Struktur liegen. Da jede IL Linie jeweils nur wenige genau definierte Genomfragmente des Donor-Elters trägt und das restliche Genom aller IL Linien ansonsten identisch mit dem des rekurrentem Elters ist, zeigen IL Linien im Allgemeinen eine deutlich geringere Variation in der Pflanzenentwicklung als z.B. spaltende Populationen aus biparentalen Kreuzungen (Keurentjes et al., 2007). Aufgrund der meist geringen phänologischen Variation in einer IL erfahren alle Linien während jeder Entwicklungsphase eines Experiments sehr ähnliche Umweltbedingungen, was dem Auftreten von umweltbedingten Korrelationen zwischen $\Delta^{13}\text{C}$ und Merkmalen der Pflanzenentwicklung vorbeugt. So ist es beispielsweise denkbar, dass in Populationen mit großer Variation in der Pflanzenentwicklung das für die Analyse von $\Delta^{13}\text{C}$ verwendete Pflanzenmaterial in den sich schneller entwickelnden Individuen der Population unter einem anderen δ_l produziert wurde als in den Individuen mit

langsamerer Entwicklung. Diese Differenz in δ_i könnte bei einer gemeinsamen Betrachtung aller Individuen der Population in Korrelationen zwischen $\Delta^{13}\text{C}$ und der Pflanzenentwicklung resultieren.

Neben diesen umweltbedingten Korrelationen könnten aber auch genetische Zusammenhänge den in C_3 Spezies beschriebenen, engen Zusammenhang zwischen $\Delta^{13}\text{C}$ und der Pflanzenentwicklung erklären. Unter anderem wäre eine enge Kopplung zwischen Genen, die $\Delta^{13}\text{C}$ und die Pflanzenentwicklung beeinflussen oder pleiotrope Effekte einzelner Gene möglich. In *A. thaliana* untersuchten McKay et al. (2003) Gene mit Einfluss auf die Pflanzenentwicklung in Mutanten sowie in NILs und fanden Hinweise auf pleiotrope Effekte dieser Gene in Bezug auf $\delta^{13}\text{C}$. Insbesondere der Transkriptionsfaktor *FLOWERING LOCUS C* (*FLC*, Sheldon et al., 2000, Schläppi, 2001) zeigte ausgeprägte Effekte auf $\delta^{13}\text{C}$, und Genotypen mit langsamer Entwicklung waren durch ein höheres $\delta^{13}\text{C}$ charakterisiert. In der Mais IL wurden, obwohl die Korrelation zwischen Blüte und $\Delta^{13}\text{C}_K$ in der IL nicht signifikant war, über Feld bzw. GWH11 zwei Zielregionen auf den Chromosomen 1 und 5 identifiziert, die sowohl einen kleinen aber signifikanten Effekt auf $\Delta^{13}\text{C}_K$ als auch jeweils auf BLM (ID_{77IL} 29) und BLW (ID_{77IL} 76) zeigten. Ebenfalls auf Chromosom 1 wurde in GWH12_opt eine Zielregion (ID_{33IL} 18) detektiert, die sowohl $\Delta^{13}\text{C}_K$ als auch BLW beeinflusste. In allen diesen drei Zielregionen war eine langsamere Entwicklung mit niedrigeren $\Delta^{13}\text{C}_K$ Werten assoziiert. Dieser Effekt stimmt unter Berücksichtigung einer negativen Korrelation zwischen $\delta^{13}\text{C}$ und $\Delta^{13}\text{C}$ (mit $\delta_i = -8\text{‰}$, Farquhar et al., 1989, Lambers et al., 2008) mit den Beobachtungen von McKay et al. (2003) überein und könnte auf eng gekoppelte oder pleiotrope Effekte in den drei in der Mais IL identifizierten Zielregionen hinweisen. Takai et al. (2009) detektierten eine genomische Region in einer Reis IL, die sowohl $\Delta^{13}\text{C}$ als auch die Anzahl Tage bis zur Reisblüte beeinflusste. Unter Verwendung von zusätzlichen subIL Linien kamen die Autoren zu dem Schluss, dass die Kollokalisierung zwischen $\Delta^{13}\text{C}$ und Anzahl Tagen bis zur Blüte eher eine Folge enger Kopplung mehrerer Loci als eines pleiotropen Effekts eines Locus ist. Ob die drei in der Mais IL identifizierten Kollokalisierungen von Effekten auf $\Delta^{13}\text{C}_K$ und der Pflanzenentwicklung auf enger Kopplung von unterschiedlichen Loci oder auf pleiotropen Effekten basieren, ist nicht zu klären. Unter Berücksichtigung der vergleichsweise geringen Effekte dieser drei Genomregionen auf $\Delta^{13}\text{C}_K$, sowie der Tatsache, dass keine signifikante

phänotypische oder genotypische Korrelation zwischen $\Delta^{13}\text{C}_K$ und einem der erfassten Merkmale der Pflanzenentwicklung detektiert wurde, ist es jedoch äußerst wahrscheinlich, dass die in der Mais IL für $\Delta^{13}\text{C}_K$ identifizierte genotypische Variation sowie die detektierten Genomregionen nicht als Folge von Unterschieden in der Pflanzenentwicklung beobachtet wurden.

Die signifikanten Korrelationen zwischen $\Delta^{13}\text{C}_K$ und den pflanzenphysiologischen Merkmalen der Photosynthese und des Wasserhaushalts in der Mais IL unter optimaler Wasserverfügbarkeit lassen einen Einfluss der Transpiration auf die Variation von $\Delta^{13}\text{C}_K$ vermuten.

In allen Versuchen mit optimaler Wasserverfügbarkeit war $\Delta^{13}\text{C}_K$ in der Mais IL sowohl phänotypisch als auch genotypisch signifikant mit dem Chlorophyllgehalt des Kolbenblattes korreliert. Dabei unterschieden sich zwar die IL Linien, die einen signifikanten Effekt in $\Delta^{13}\text{C}_K$ aufwiesen im Chlorophyllgehalt nicht signifikant vom rekurrentem Elter, interessanterweise jedoch konnte über Feld und GWH11 wie auch in GHW12_opt eine Genomregion auf Chromosom 6 identifiziert werden, in der die Allele des Donor-Elters sowohl einen starken negativen Effekt auf $\Delta^{13}\text{C}_K$ und einen vergleichsweise großen positiven Effekt auf SPAD zeigten. Ein negativer Zusammenhang zwischen den beiden Merkmalen wurde auch in anderen Studien mit Mais, Sojabohne (Madhavan, 2012), Steinklee (*Melilotus alba*, Bevins et al., 1993) und Weizen (Araus et al., 1997, Wu et al., 2011) gefunden. In Baumwolle und Weizen wurde zudem die Koloalisation von mehreren QTL für die Kohlenstoffisotopendiskriminierung und den Chlorophyllgehalt der Blätter berichtet (Saranga et al., 2001, Wu et al., 2011). Madhavan (2012) stellte bezüglich des Zusammenhangs zwischen dem Chlorophyllgehalt und $\Delta^{13}\text{C}$ die Hypothese auf, dass ein höherer Chlorophyllgehalt mit einer beschleunigten RuBisCO-Regenerierung einhergeht und somit zu einer Effizienzsteigerung der photosynthetischen Prozesse führt. Positive Korrelationen zwischen dem Chlorophyllgehalt der Blätter und der Photosynthesekapazität wurden zuvor u.a. in Weizen berichtet (Araus et al., 1997). In der Mais IL konnte keine signifikante genotypische Variation in der maximalen Photosynthesekapazität ($F_vF_M^{-1}$) festgestellt werden. Dies ist aber möglicherweise primär der geringen Wiederholbarkeit der Messungen dieses Merkmals geschuldet. Inwieweit die Assoziation der Genomregion auf Chromosom 6 mit $\Delta^{13}\text{C}_K$ tatsächlich auf genotypischen Unterschieden in der Photosynthesekapazität basiert, ist unklar,

jedoch impliziert das theoretische Modell von Farquhar (1983) eine Abhängigkeit von $\Delta^{13}\text{C}$ von $c_i c_a^{-1}$ und somit sowohl von der Photosynthesekapazität als auch von der stomatären Leitfähigkeit.

Die Abhängigkeit von $\Delta^{13}\text{C}$ von der stomatären Leitfähigkeit bzw. Transpiration spiegelt sich möglicherweise in der im GWH12_opt detektierten positiven Korrelation zwischen $\Delta^{13}\text{C}_K$ und der Blatttemperatur in der Mais IL wider. Die Blatttemperatur kann dabei als indirekte Messung der stomatären Leitfähigkeit bzw. der Transpiration betrachtet werden (Monneveux & Ribaut, 2006, Jones et al., 2009, Liu et al., 2011, Masuka et al. 2012). Dabei stellt eine höhere Blatttemperatur ein Anzeichen für geringere Transpiration bzw. stomatäre Leitfähigkeit dar, und hohe $\Delta^{13}\text{C}_K$ Werte traten somit in der IL in Kombination mit geringer Transpiration auf. Obwohl $\Delta^{13}\text{C}_K$ und die Blatttemperatur in GWH12_opt signifikant phänotypisch korrelierten, konnten keine IL Linien identifiziert werden, die sich sowohl in $\Delta^{13}\text{C}_K$ und der Blatttemperatur signifikant von IL-RE unterschieden. Auch konnte keine Koloaliation von QTL für diese beiden Merkmale detektiert werden. Dies war jedoch nicht überraschend, da die Messung der Blatttemperatur mit einem relativ großen Fehler verbunden war und dieses Merkmal unter allen erfassten Merkmalen mit signifikanter genetischer Varianz die geringste Wiederholbarkeit zeigte. Neben den signifikanten Korrelationen von $\Delta^{13}\text{C}_K$ mit dem Chlorophyllgehalt und mit der Blatttemperatur korrelierte $\Delta^{13}\text{C}_K$ sowohl im Feld als auch in GWH12_opt signifikant mit dem Merkmal AK. Dabei war diese Korrelation zwischen $\Delta^{13}\text{C}_K$ und AK negativ, sodass tendenziell die IL Linien, welche höhere $\Delta^{13}\text{C}_K$ Werte zeigten, gleichzeitig eine geringere Anzahl an Körnern produzierten. Diese negative Korrelation zwischen $\Delta^{13}\text{C}$ und dem Kornertrag unter Wachstumsbedingungen mit optimaler Wasserverfügbarkeit wurde auch in der C_4 Spezies *Sorghum bicolor* beschrieben (Hubick et al., 1990). Unter Annahme, dass hohe $\Delta^{13}\text{C}_K$ Werte in der Mais IL mit geringer Transpiration und somit kleinem $c_i c_a^{-1}$ assoziiert sind, deutet die negative Korrelation zwischen $\Delta^{13}\text{C}_K$ und AK darauf hin, dass unter optimaler Wasserverfügbarkeit tendenziell die IL Linien, die eine höhere Transpiration zeigten, auch eine größere Anzahl an Körnern je Kolben produzierten. Dieser Zusammenhang wird zudem durch die negative Korrelation zwischen AK und BT gestützt. Sowohl im Feld als auch in GWH12_opt wurden je zwei unterschiedliche Genomregionen identifiziert, die sowohl $\Delta^{13}\text{C}_K$ als auch AK beeinflussen. In drei dieser Zielregionen waren die Allele, die in höheren $\Delta^{13}\text{C}_K$ Werten resultierten, mit

kleinerem AK assoziiert. Jeweils eine der im Feld bzw. GWH12_opt identifizierten Genomregionen war auf Chromosom 2 lokalisiert, wobei diese beiden Genomregionen auf Chromosom 2 nicht direkt benachbart waren. Ob diese Diskrepanz auf Chromosom 2 sowie die geringe Kolokalisation zwischen Genomregionen mit Einfluss auf $\Delta^{13}\text{C}_K$ und AK tatsächlich auf unterschiedliche genetische Faktoren zurückzuführen ist oder ein Effekt der statistischen Auflösung (77 IL vergl. mit 33 IL) bzw. des Detektionsvermögens (jeweils nur 3 bzw. 6 Wiederholungen) ist, muss in weiteren Untersuchungen geklärt werden.

Die signifikanten Korrelationen zwischen $\Delta^{13}\text{C}_K$ und dem trockenstressspezifischen Merkmal Blattrollen bzw. zwischen $\Delta^{13}\text{C}_K$ und dem Ertragsparameter Anzahl Körner je Pflanze in der Mais IL weisen darauf hin, dass $\Delta^{13}\text{C}_K$ auch in der C_4 Spezies Mais als Selektionsmerkmal in Umwelten mit suboptimaler Wasserverfügbarkeit in Betracht gezogen werden kann.

Basierend auf den 33 IL Linien, die unter suboptimaler Wasserverfügbarkeit im GWH12_sub getestet wurden, ergaben sich signifikante phänotypische Korrelationen zwischen $\Delta^{13}\text{C}_K$ und den physiologischen Merkmalen BR und AK. So korrelierte $\Delta^{13}\text{C}_K$ unter suboptimaler Wasserverfügbarkeit negativ mit dem Merkmal Blattrollen und positiv mit AK. Die negative Korrelation mit BR spiegelt sich auch auf Ebene der IL Linien wider, die sich in $\Delta^{13}\text{C}_K$ und BR signifikant von IL-RE unterschieden. So zeigten drei IL Linien sowohl signifikant höhere $\Delta^{13}\text{C}_K$ wie auch signifikant geringere BR Werte, und die IL Linien mit den geringsten $\Delta^{13}\text{C}_K$ Werten zeigten auch signifikant mehr BR. Obwohl Blattrollen ein allgemein bekannter Anpassungsmechanismus gegenüber Wassermangel ist, sind die physiologischen Prozesse, welche mit BR assoziiert sind, vielfältig und bisher nur teilweise verstanden (Kadioglu et al., 2012). In Reis konnte gezeigt werden, dass mit zunehmendem Blattrollen eine Reduktion der von der Sonne beschienenen Blattfläche, der Transpiration und der Photosynthese verbunden ist (Allah, 2009). Im Gegensatz dazu berichten Matthews et al. (1990), dass trockenstresstolerante Sorghumlinien stärkeres Blattrollen zeigten als trockenstressanfällige Linien, wahrscheinlich indem das Blattrollen ein spezifisches Mikroklima auf den Blattoberflächen schafft, welches den Pflanzen erlaubt, die Stomata unter Trockenstress geöffnet zu lassen. Somit scheint der Effekt des Blattrollens auf die Transpiration zwischen Spezies und möglicherweise auch

innerhalb einer Spezies variabel zu sein (Kadioglu & Terzi, 2007), was die Interpretation der negativen Korrelation zwischen $\Delta^{13}\text{C}_K$ und BR schwierig gestaltet. Einen Zusammenhang zwischen Trockenstressanpassung, BR und $\Delta^{13}\text{C}_K$ Werten stützen auch die jeweiligen Korrelationen mit dem Ertragsparameter AK. So zeigte BR eine signifikant negative und $\Delta^{13}\text{C}_K$ eine signifikant positive phänotypische Korrelation mit AK. Die positive Korrelation zwischen $\Delta^{13}\text{C}_K$ und AK in GWH12_sub steht im Kontrast zu der bereits beschriebenen negativen Korrelation zwischen $\Delta^{13}\text{C}_K$ und AK in Umwelten mit optimaler Wasserverfügbarkeit, findet jedoch Unterstützung in der von Monneveux et al. (2007) beschriebenen positiven Korrelation zwischen $\Delta^{13}\text{C}$ und dem Kolbengewicht nach der Ernte unter Trockenstress. Ebenso zeigten trockenstresstolerante Mais Hybriden signifikant höhere $\Delta^{13}\text{C}$ Werte der Blätter und gleichzeitig höhere Kornerträge unter Feldbedingungen als trockenstressanfällige Hybriden (Monneveux et al., 2007). Von den acht IL Linien, die sich unter suboptimaler Wasserverfügbarkeit signifikant von IL-RE in $\Delta^{13}\text{C}_K$ unterschieden, waren jedoch nur zwei IL Linien (IL-57, IL-58) signifikant unterschiedlich von IL-RE in AK. Eine mögliche Ursache für die geringe Überlappung von IL Linien, die sich in $\Delta^{13}\text{C}_K$ und AK signifikant von IL-RE unterschieden, könnte die negative Korrelation zwischen AK und ASI sein. Die Bedeutung eines möglichst kurzen ASI für den Kornertrag von Mais unter Trockenstress stimmt dabei mit Aussagen anderer Studien überein (u.a. Hall et al., 1982, Bolaños & Edmeades, 1996).

4.2. Genotypische Struktur der Introgressionsbibliothek

4.2.1. Eignung und Verlässlichkeit des MaizeSNP50 BeadChip

Der MaizeSNP50 BeadChip ermöglicht eine reproduzierbare hochauflösende Genotypisierung der IL, wobei sowohl die Verteilung der SNP Marker als auch die Verteilung der polymorphen SNP eher die spezifischen Charakteristika des Chips als biologische Phänomene widerspiegeln.

Die Veröffentlichung der ersten Mais Referenzsequenz (Schnable et al., 2009) ermöglichte die physikalische Kartierung von SNP und anderer struktureller Varianten im Maisgenom und führte zur Entwicklung von einfach handhabbaren Hochdurchsatz-Genotypisierungsmethoden in Mais (Ganal et al., 2011). Zu diesen

zählt die Chip-basierte Hochdurchsatz-SNP-Genotypisierung. Der von Illumina Inc. und Projektpartnern entwickelte SNP-Genotypisierungs-Chip, MaizeSNP50 BeadChip, umfasst 56.110 SNP Marker, die vorwiegend in Genen lokalisiert sind und das gesamte Maisgenom gleichmäßig abdecken sollen. Der überwiegende Teil der 56.110 SNP Marker stammt dabei aus Sequenzvergleichen zwischen US-Amerikanischen Zahnmais-Inzuchtlinien (Ganal et al., 2011). Zum Zeitpunkt der Genotypisierung der IL mit dem MaizeSNP50 BeadChip lagen keine publizierten Ergebnisse zur Eignung bzw. Verlässlichkeit des Chips insbesondere in europäischem Hartmaismaterial vor. Um der bekanntermaßen hohen Sequenzpolymorphie innerhalb von Mais Rechnung zu tragen (Gore et al., 2009, Springer et al., 2009) und um diese neuartige Genotypisierungsplattform zu testen, wurde daher die Verlässlichkeit und Eignung des MaizeSNP50 BeadChip für die Charakterisierung des spezifischen Pflanzenmaterials IL-RE x IL-DE, respektive eine Kombination aus einer europäischen Zahnmais- und einer europäischen Hartmais-Inzuchtlinie, untersucht. Hierfür wurden biologische Replikate der beiden Eltern der IL mit dem MaizeSNP50 BeadChip genotypisiert. Von den gesamten 56.110 SNP wurden bereits vor der Überprüfung der Verlässlichkeit des Chips im spezifischen Material 23.916 SNP von der Analyse ausgeschlossen, sodass 32.194 SNP in der Analyse verblieben. Diese Vorabselektion entfernte SNP Marker, die sich zuvor in einem diversen Set europäischen Pflanzenmaterials (Bauer et al. 2013) als wenig verlässlich bzw. technisch nicht auswertbar erwiesen. Die nach diesem ersten Selektionsschritt verbliebene Zahl an SNP in der Analyse (32.194 SNP) ist deutlich niedriger als die Anzahl an SNP Markern, die in vorwiegend US-Amerikanischen Inzuchtlinien verlässlich auszuwerten waren (49.585 SNP, Ganal et al., 2011), jedoch in einer ähnlichen Größenordnung wie die von Strigens et al. (2013) in einem diversen Set von US-Amerikanischen Zahnmais-, europäischen Zahnmais- und europäischen Hartmais-Inzuchtlinien beschriebene Anzahl an verwendbaren SNP. Die geringe Anzahl an verlässlich auswertbaren SNP in Pflanzenmaterial, welches insbesondere europäische Hartmais-Inzuchtlinien beinhaltet, verglichen mit der Anzahl an SNP, die in rein US-Amerikanischem Material auswertbar ist, beruht möglicherweise auf der Tatsache, dass der überwiegende Teil der 56.110 auf dem MaizeSNP50 BeadChip befindlichen SNP aus dem Sequenzvergleich von US-Inzuchtlinien stammt und könnte die hohe Sequenzdiversität zwischen US-

Amerikanischem Material und insbesondere europäischem Flintmaterial widerspiegeln.

Der Erfolg der Vorabselektion spiegelt sich in der geringen Zahl der 32.194 SNP Marker wider, die keine einheitlichen Ergebnisse über die biologischen Replikate von IL-RE und IL-DE ergaben. Über die biologischen Replikate von IL-RE zeigten 3,16 % und über die biologischen Replikate von IL-DE zeigten 0,62 % der 32.194 SNP kein einheitliches Allel an den jeweiligen SNP-Loci. Dies verdeutlicht eine sehr hohe Verlässlichkeit und Reproduzierbarkeit der Ergebnisse der Genotypisierung auf Basis des MaizeSNP50 BeadChip. Obwohl der Anteil an SNP, die kein einheitliches Allel über die jeweiligen biologischen Replikate ergaben, sehr gering war, zeigte sich dennoch ein deutlicher Unterschied in der Konsistenz der Allele zwischen den biologischen Replikaten von IL-RE und IL-DE. So zeigte über die biologischen Replikate von IL-DE kein SNP Marker an einem Locus zwei verschiedene homozygote Allele und nur sechs SNP Loci zeigten sowohl homozygote als auch heterozygote Allele. Im Gegensatz dazu ergaben sich in den biologischen Replikaten von IL-RE an 43 SNP Loci uneinheitliche homozygote Allele und an 726 Loci wurden sowohl homozygote und heterozygote Allele detektiert. Da diese SNP Loci mit inkonsistenten Allelen über die biologischen Replikate von IL-RE nicht zufällig über das Genom verteilt waren, sondern in zusammenhängenden Clustern auftraten, scheint es naheliegend, dass diese Inkonsistenzen nicht auf Fehlern in der Genotypisierung beruhen, sondern tatsächlich geringe Unterschiede zwischen den biologischen Replikaten von IL-RE bestehen. Ähnliche Inkonsistenzen zwischen biologischen Replikaten im Zusammenhang mit einer hochauflösenden SNP Genotypisierung wurden auch von Ganai et al. (2011) und Pea et al. (2013) beschrieben und könnten aus einer Verunreinigung während der Erhaltungszucht dieser Inzuchtlinien oder auf leichte Unterschiede im Inzuchtgrad zwischen den biologischen Replikaten hindeuten.

Für einen möglichst vollständigen Überblick über die Genomstruktur einer IL ist neben der Markerdichte eine möglichst homogene Verteilung der Marker und dabei insbesondere die Verteilung der polymorphen Marker über das Genom notwendig. Sowohl die Verteilung aller 32.194 SNP Marker, wie auch der 11.505 zwischen IL-RE und IL-DE polymorphen SNP war über die 10 Maischromosomen aber insbesondere innerhalb der Maischromosomen, unterteilt in 10 Mb große Bins, uneinheitlich. Dabei konnte jedoch mindestens ein SNP alle 10 Mb detektiert werden, sodass keine

größeren Lücken in der Markerabdeckung die Detektion von größeren Donorgenomfragmenten verhindert hätte. Generell zeigte die uneinheitliche Verteilung der SNP Marker eine deutliche Tendenz zu einer Häufung von SNP Markern an den distalen (Telomer-nahen) Regionen gegenüber den perizentromeren Regionen. Diese Tendenz spiegelt wahrscheinlich die Prozedur der Markerselektion in der Entwicklung des MaizeSNP50 BeadChip wider, wobei SNP Marker, die innerhalb von Genen lokalisiert sind, bevorzugt selektiert und in den Chip aufgenommen wurden (Ganal et al., 2011). Diese bevorzugte Selektion in Kombination mit der höheren Gendichte in den distalen Regionen, verglichen mit den perizentromeren Regionen der Chromosomen (Schnable et al., 2009) wäre eine Erklärung für die beobachtete Überrepräsentation von SNP Markern in den distalen Chromosomenregionen. Durch die hohe Korrelation zwischen der gesamten Anzahl SNP Marker und der Anzahl an polymorphen Markern je Bin folgte auch die Verteilung der polymorphen SNP Marker der bereits diskutierten Tendenz. Aufgrund der gerichteten Selektion von SNP während der Chip Entwicklung bezüglich Polymorphismen zwischen US-Amerikanischen Inzuchtlinien und der damit einhergehenden verzerrten Aussagekraft zur genetischen Diversität (Frascaroli et al., 2013) können die Genomregionen mit geringerer Polymorphie zwischen IL-RE und IL-DE nicht unbedingt als Genomregionen mit reduzierter genetischer Diversität zwischen diesen beiden Inzuchtlinien betrachtet werden. Es wird daher davon abgesehen, diese Regionen im Zusammenhang mit gemeinsamen Vorfahren („identical by descent“, Bernardo et al., 1996) zu diskutieren.

Aufgrund der hohen Reproduzierbarkeit der Genotypisierungsergebnisse über die biologischen Replikate der Eltern der IL sowie der ausreichend gleichmäßigen Verteilung der polymorphen Marker wurde die gesamte IL mit dem MaizeSNP50 BeadChip genotypisiert. Die wiederholten Rückkreuzungsschritte mit dem rekurrentem Elter während der Entwicklung der IL führten zu einer stark reduzierten Anzahl an fixierten Rekombinationsereignissen je IL Linie, verglichen mit anderen spaltenden Populationen, wie DH- oder RIL-Populationen. Dadurch konnte die Anzahl an SNP Markern, die eine vollständige Beschreibung der Genomstruktur der IL Linien ermöglicht, auf 1.861 SNP reduziert werden, ohne Verlust an genetischer Information. Der größte Vorteil dieser nachträglichen Reduktion an Markern ist, neben einer deutlich vereinfachten Handhabbarkeit, spezifisch die Marker selektieren zu können, die mit höchst möglicher Qualität die IL beschreiben. Diese nachträgliche

Reduktion der Markeranzahl bedeutet aber nicht, dass bereits eine anfängliche Genotypisierung mit ca. 2.000 Markern, im Gegensatz zu den tatsächlich verwendeten 32.194 SNP, ausgereicht hätte, um die IL vollständig genotypisch zu beschreiben. Die detaillierte Information zur Position der einzelnen Donorgenomfragmente, basierend auf 32.194 SNP, war für die Selektion der 1.861 SNP ausschlaggebend. Zudem stellen die zwischen IL-RE und IL-DE polymorphen Marker, die nicht in den 1.861 Marken enthalten sind, eine wertvolle Ressource für die Feinkartierung von Genomregionen mit signifikanten Effekten auf die phänotypische Ausprägung dar.

4.2.2. Genotypische Struktur der Introgressionsbibliothek mit SSR und SNP Markern

Nur die hochauflösende Genotypisierung mit mehreren tausend Markern ermöglicht einen Einblick in die tatsächliche genetische Struktur der IL.

Die hochauflösende Genotypisierung der IL zeigte, dass über alle IL Linien 90 % des mit SNP Markern abgedeckten Donorgenoms repräsentiert werden. Durch diese sehr hohe Donorgenomabdeckung besteht daher eine hohe Wahrscheinlichkeit, dass jegliche genotypische Unterschiede zwischen den Eltern der IL mit Hilfe der einzelnen IL Linien spezifischen Donorgenomfragmenten zugeordnet werden können. Die 90 % Donorgenomabdeckung stellen jedoch möglicherweise eine leichte Überschätzung der tatsächlichen Donorgenomabdeckung dar. Das mit SNP Markern darstellbare Genom überspannt 2,04 Gb, die B73 Referenzsequenz hat eine Länge von 2,06 Gb und das gesamte Mais Genom wird auf ca. 2,3 Gb geschätzt (Schnable et al., 2009). Es ist wahrscheinlich, dass das Genom beider IL Eltern größer als die mit SNP Markern abgedeckten 2.04 Gb ist und somit einige Genombereich nicht mit SNP Marken darstellbar sind. In diesen Genombereichen liegen weder Informationen zur Donorgenomabdeckung, noch zum Auftreten von Donorgenomfragmenten in den einzelnen IL Linien vor.

Innerhalb des mit SNP Markern abgedeckten Genoms zeigte sich ausschließlich auf den Chromosomen 4 und 6 eine unterdurchschnittliche Donorgenomabdeckung. Diese unterdurchschnittliche Donorgenomabdeckung der Chromosomen 4 und 6 zeigte sich auch in der Genotypisierung mit SSR Markern, sodass möglicherweise bereits während der Entwicklung der IL keine Linien mit geeigneten

Donorgenomfragmenten in diesen Regionen identifiziert werden konnten. Bauer et al. (2013) verglichen die Rekombinationsrate von 22 europäischen Maisinzuchtlinien und fanden auf Chromosom 4 über alle Inzuchtlinien die geringste Rekombinationsrate. Auf dem kurzen Arm von Chromosom 6 wurde zudem eine deutliche Reduktion der Rekombinationshäufigkeit, möglicherweise aufgrund der *nucleolar organizer region* in diesem Genombereich (Phillips et al., 1971), detektiert. Die geringe Donorgenomabdeckung des Chromosoms 6 in der IL beruht primär auf dem Fehlen von Donorgenomfragmenten auf dem kurzen Arm. Unter Annahme, dass auch in der IL das Chromosom 4 und der kurze Arm von Chromosom 6 eine stark reduzierte Rekombinationsrate aufweisen, besteht die Möglichkeit, dass diese geringe Rekombinationsrate entweder bereits das Auftreten von Rekombinationen in den sieben F₂ Pflanzen, aus denen die IL entwickelt wurde, oder die Reduktion von überlangen Donorgenomfragmenten in den Rückkreuzungsschritten behinderte. Beides könnte die Identifikation von IL Linien mit geeigneten Donorgenomfragmenten und damit die Donorgenomabdeckung auf den Chromosomen 4 und 6 negativ beeinflusst haben.

Die hochauflösende Genotypisierung der IL mit 32.194 SNP Markern ergab, dass nahezu 50 % der IL Linien mehr als ein Donorgenomfragment tragen. Im Durchschnitt über alle IL Linien betrachtet zeigte jede IL Linie 2,1 Donorgenomfragmente. Dies war aufgrund der Ergebnisse der Genotypisierung mit 226 SSR Markern, die für die finale Erstellung der IL verwendet wurden, unerwartet. Basierend auf den 226 SSR Markern trugen viel weniger IL Linien mehr als ein Donorgenomfragment (Durchschnitt je IL Linie 1,5 Donorgenomfragmente). Die Diskrepanz zwischen der Genotypisierung mit SNP und SSR Markern beruht überwiegend auf der zusätzlichen Detektion einer Vielzahl kleiner Fragmente (< 10 Mb) in den distalen Regionen der Chromosomen durch die hochauflösende Genotypisierung mit SNP Markern. Somit erscheint eine hochauflösende Genotypisierung mit mehreren tausend Markern unabdingbar, um einen detaillierten Überblick über die genetische Zusammensetzung einer Introgressionsbibliothek zu bekommen. Ähnliche Ergebnisse wurden für eine Gersten-Introgressionsbibliothek berichtet, die zunächst mit 98 SSR Markern genotypisiert worden war (Schmalenbach et al., 2008). Basierend auf der Genotypisierung mit SSR Markern war davon auszugehen, dass jede Gersten Introgressionslinie ein einziges Donorgenomfragment trug. Die erneute Genotypisierung dieser Gersten

Introgressionsbibliothek mit 636 SNP Markern zeigte jedoch, dass im Durchschnitt jede Gersten-Introgressionslinie zusätzlich 1,5 Donorgenomfragmente trug, die zuvor mit SSR Markern nicht erfasst worden waren (Schmalenbach et al., 2011). Dies ist ein deutlicher Hinweis darauf, dass in der Realität Introgressionsbibliotheken deutlich von idealen Introgressionsbibliotheken, mit jeweils nur einem einzelnen Donorgenomfragment je Linie, wie von Eshed & Zamir (1994) definiert, abweichen. Das Auftreten von mehr als einem Donorgenomfragment je Introgressionslinie erschwert die direkte Zuordnung phänotypischer Effekte zu einzelnen Genombereichen.

Die tatsächliche Anzahl an Donorgenomfragmenten je IL könnte jedoch noch etwas höher als 2,1 sein, da einige kleinere Donorgenomfragmente (< 5 Mb), die nur von einem oder zwei SNP repräsentiert wurden und parallel in mehreren IL Linien auftraten, aus der Analyse ausgeschlossen wurden. Da die IL Linien, die diese identischen, sehr kleinen Donorgenomfragmente zeigten, in den meisten Fällen auf unterschiedliche F₂- bzw. BC₁-Pflanzen zurückgingen, erschien das Auftreten von parallelen Doppel-Crossover bedingt durch die Chromatiden-Interferenz als äußerst unwahrscheinlich. Es wurde daher angenommen, dass diese kleinen Donorgenomfragmente aus einer fehlerhaften physikalischen Lokalisation der SNP Loci resultieren. Die physikalische Lokalisation der SNP Loci beruht auf der B73 Refseq_v2 Referenzsequenz und eine fehlerbehaftete Projektion der Positionsangaben auf andere Inzuchtlinien wurde bereits mehrfach beschrieben (Ganal et al., 2011, Bauer et al., 2013). Dennoch könnten, unter Annahme eines Chromatiden-Interferenz unabhängigen Rekombinationsprozesses (Bauer et al., 2013), manche dieser kleinen Fragmente tatsächliche Donorgenomfragmente darstellen.

4.2.3. Statistische Verfahren für die Detektion von Genomregionen mit Einfluss auf die phänotypische Merkmalsausprägung

Die schrittweise multiple Regression mit einem auf BIC basierten Modellvergleich bietet den besten Kompromiss aus Spezifität und Sensitivität und liefert konsistente Ergebnisse in experimentellen Daten.

Die Identifikation von Genen, die die Ausprägung quantitativ vererbter Merkmale beeinflussen, stellt nach Luo et al. (2002) in den kommenden Jahrzehnten die größte

Herausforderung für Genetiker dar. Die Erfolge der QTL Kartierung, eine Methode um Gene mit Effekten auf quantitative Merkmale in spaltenden, bi-parentalen Populationen wie F₂-, DH- oder RIL-Populationen zu identifizieren, wurden kürzlich durch Price (2006) zusammengefasst. Diese Erfolge beruhen zu einem großen Teil auf statistischen Methoden wie der Intervallkartierung (Lander & Botstein, 1989) oder der Intervallkartierung unter Berücksichtigung von Kovariablen (Zeng, 1994). Eine Grundannahme dieser Methoden ist die zufällige Spaltung der Allele an jedem Locus. Da IL eine Zusammenstellung selektierter Nachkommen darstellen, wird diese Grundannahme verletzt und die direkte Verwendung dieser statistischen Methoden für die QTL Kartierung in IL ist nicht möglich.

In den meisten bisherigen Studien, die mittels einer IL differenzielle genotypische Ausprägungen in einzelne Genomregionen aufteilten, erfolgte die statistische Assoziation zwischen phänotypischer Ausprägung und Genomregionen daher auf Basis einer Reihe von Mittelwertvergleichen zwischen den einzelnen IL Linien und dem rekurrenten Elter (Mahone et al., 2012). Unter der Annahme, dass jede IL Linie nur ein Donorgenomfragment trägt, sollte jeder statistisch signifikante genotypische Unterschied zwischen einer IL Linie und dem rekurrentem Elter ausschließlich auf dem Vorhandensein des Donorgenomfragments beruhen. Ein signifikanter Mittelwertunterschied zwischen IL Linie und dem rekurrenten Elter lässt somit direkt auf einen oder mehrere QTL innerhalb des jeweiligen Donorgenomfragments schließen, die die phänotypische Ausprägung beeinflussen (Eshed & Zamir, 1995). Die hochauflösende Genotypisierung der Mais IL verdeutlicht jedoch die Diskrepanz zwischen einer theoretischen, idealen IL mit nur einem einzigen Genomfragment je IL Linie und der in der Praxis auftretenden IL mit deutlich mehr als einem Donorgenomfragment je Linie. In IL mit deutlich mehr als einem Donorgenomfragment je IL Linie lässt ein signifikanter Mittelwertvergleich keinen direkten Zusammenhang zwischen der phänotypischen Ausprägung und einer einzelnen Donorgenomregion zu. Es sind somit, insbesondere in nicht idealen IL, komplexere statistische Methoden notwendig, um die für bestimmte phänotypische Ausprägungen verantwortlichen Genombereiche identifizieren zu können.

In einer Simulationsstudie unterteilten Falke & Frisch (2011) die Donorgenomfragmente innerhalb einer IL in individuelle Zielregionen und verwendeten diese Zielregionen als Prädiktorvariablen in einem linearen Modell. Die grundlegende Intention dieser Methode ist, dass an Stelle des Vergleichs einer IL

Linie mit dem rekurrenten Elter gleichzeitig für eine Zielregion alle IL Linien mit Donorallelen gegen alle IL Linien mit den Allelen des rekurrenten Elters getestet werden. Dabei wird eine präzisere Schätzung des Restfehlers und eine erhöhte Testgüte erreicht (Mahone et al., 2012). Zudem berücksichtigt die simultane Schätzung der Effekte aller Zielregionen in einem linearen Modell die Tatsache, dass die einzelnen Zielregionen statistisch nicht unabhängig sind. Die praktischen Vorteile dieser Methode gegenüber den paarweisen Mittelwertvergleichen wurden sowohl in einer Raps als auch in einer Roggen IL demonstriert (Mahone et al., 2012, Mahone et al., 2013), jedoch ist die Anwendung auf Situationen beschränkt, in denen weniger Prädiktorvariablen zu schätzen sind als Beobachtungen zur Verfügung stehen. In der Mais IL, basierend auf 89 IL Linien, wurden aber doppelt so viele Zielregionen, also mögliche Prädiktoren, identifiziert als Beobachtungen zur Verfügung stehen, sodass eine simultane Schätzung der Effekte aller Prädiktoren in einem klassischen linearen Modell nicht möglich ist.

Wang et al. (2006) entwickelten eine Methode, basierend auf einer schrittweisen Modellselektion, um QTL in einer Reis IL zu identifizieren und verglichen die jeweilige Testgüte der QTL Detektion zwischen einer Einzelmarkerregression und der von ihnen entwickelten schrittweisen Regressionsmethode. Sowohl in Situationen mit einer höheren Anzahl an Beobachtungen als mögliche Prädiktoren, wie auch in der Situation mit einer etwas geringeren Anzahl an Beobachtungen als vorhandenen Prädiktoren, zeigte die Methode, basierend auf der schrittweisen Regression, eine deutlich höhere Testgüte als die Einzelmarkerregression.

In Anlehnung an diese beiden Methoden von Falke & Frisch (2011) und Wang et al. (2006), aber unter Berücksichtigung der Tatsache, dass in der Mais IL die Anzahl der Prädiktoren die Anzahl an Beobachtung deutlich übertrifft, wurde eine Simulationsanalyse, basierend auf der tatsächlichen genetischen Struktur der Mais IL, durchgeführt. Ziel dieser Analyse war es, eine Methode zu identifizieren, die eine verlässliche Detektion von Genomregionen mit Einfluss auf die phänotypische Expression zulässt.

Die Einzelmarkerregression unter Berücksichtigung multiplen Testens zeigte, ähnlich wie in der Studie von Wang et al. (2006), die geringste Sensitivität aller getesteten Methoden. Dies war zu erwarten, da die Korrektur der Signifikanzschwelle für multiples Testen nach Bonferroni bekanntermaßen eine sehr konservative Methode ist. Über alle Tests betrachtet erfolgt die Kontrolle des Fehlers erster Art (falsch

Positive) deutlich auf Kosten eines sehr hohen Fehlers zweiter Art (falsch Negative) (Falke & Frisch, 2011). Übereinstimmend damit zeigte SMR_BK auch die höchste Spezifität aller getesteten Verfahren. Benjamini & Hochberg (1995) schlugen an Stelle der Kontrolle des Fehlers erster Art die etwas weniger konservative Kontrolle der FDR vor. Da in der IL die fälschlicherweise als positiv gewerteten Zielregionen jedoch nicht ausschließlich eine Folge multiplen Testens sind, sondern möglicherweise auf hoher Multikollinearität der Zielregionen beruhen, erscheint die Kontrolle der FDR für multiples Testen in einer IL als weniger geeignet (Falke & Frisch, 2011). Der Verzicht auf eine Korrektur für multiples Testen (SMR) resultierte hingegen in einer deutlich höheren Sensitivität, wobei jedoch gleichzeitig ein starkes Abfallen der Spezifität, also deutlich mehr fälschlicherweise als Positive gewertete Zielregionen, beobachtet wurde.

Die Kombination aus ridge regression BLUP und einer auf Permutation basierten Variablenselektion (TRR_BLUP) wurde als Pendant zu dem linearen Modell von Falke & Frisch (2011) getestet, da bei dieser Methode ebenfalls zunächst die Effekte aller möglichen Prädiktoren geschätzt werden und anschließend deren Signifikanz getestet wird. Dem Umstand, dass mehr Prädiktoren zu schätzen sind als Beobachtungen zur Verfügung stehen, wird Rechnung getragen, indem die geschätzten Effekte gegen Null geschrumpft werden (Hoerl & Kennard, 1970). Dabei wird die Schätzung der Effekte der Prädiktoren aufgrund des so genannten „grouping effects“ stark vom Ausmaß der Multikollinearität beeinflusst (Ishwaran & Rao, 2011, Wimmer et al., 2013). Multikollinearität beruht in der IL vor allem auf hohem LD zwischen benachbarten Zielregionen (Abbildung 9), weshalb der simulierte Effekt einer Zielregion auf weitere Zielregionen in direkter Nachbarschaft aufgeteilt wird. Die Aufteilung der jeweiligen simulierten Effekte einzelner Zielregion auf die jeweils benachbarten Zielregionen prädestiniert möglicherweise für die Detektion falsch positiver Effekte und erklärt die geringste Spezifität von TRR_BLUP unter allen in der Simulation getesteten Verfahren. Eine höhere Spezifität von TRR_BLUP wäre jedoch sicherlich durch eine Korrektur der Permutation-basierten Signifikanzschwelle für multiples Testen möglich, wobei die Problematik in der Wahl des geeignetsten Korrekturverfahrens dem bereits Diskutierten entspricht.

Obwohl die schrittweise Regression, basierend auf dem Modellvergleich mittels dem AIC, und die schrittweise Regression, basierend auf dem Modellvergleich mittels dem BIC, zwei sehr ähnliche Methoden darstellen, ergaben sich in der Simulationsstudie

deutliche Unterschiede zwischen diesen beiden Verfahren. SR_BIC zeigte über alle Heritabilitätswerte eine geringere Sensitivität, aber eine deutlich höhere Spezifität als SR_AIC. Dies lässt sich durch die Unterschiede in den jeweiligen Definitionen von BIC und AIC erklären. Beide Parameter der Modellanpassung berücksichtigen zunächst in gleicher Weise die Anzahl an Beobachtungen und die Summe der Residuenquadrate. Der Term für eine größere Zahl an Prädiktoren im Modell unterscheidet sich jedoch insofern, als dass BIC in den meisten Fällen die Aufnahme einer weiteren Prädiktorvariable in das Modell stärker bestraft als AIC das tut. Somit bevorzugt BIC deutlich kleinere Modelle als AIC. Aufgrund des hohen LD in der IL besteht generell die Tendenz, die tatsächlich simulierten Effekte auf weitere Zielregionen, die mit der tatsächlichen Zielregion in hohem LD stehen, aufzuteilen. Die höhere Spezifität von BIC, verglichen mit AIC, scheint daher darauf zu beruhen, dass BIC stärker als AIC der Aufteilung der simulierten Effekte auf mehrere Zielregionen entgegenwirkt.

Bereits die spezifische genetische Struktur einer IL veranschaulicht, dass eine IL prinzipiell nicht geeignet ist, jede Genomregion zu identifizieren, die ein bestimmtes quantitatives Merkmal beeinflusst. Vielmehr ist das primäre Ziel einer IL die Genomregionen mit den größten Effekten auf die phänotypische Ausprägung zu identifizieren, um in weiteren Arbeitsschritten entweder deren kausale genetische Ursachen zu analysieren oder diese Genomregionen direkt durch die Methode des „breeding by design“ (Peleman & van der Voort, 2003) züchterisch zu nutzen. Somit ist eine hohe Spezifität in der Identifikation der relevanten Genomregionen stärker zu bewerten als eine möglichst hohe Sensitivität. Unter einer höheren Gewichtung der Spezifität zeigte die Methode SR_BIC den besten Kompromiss aus Spezifität und Sensitivität aller betrachteten Methoden und wurde daher in der Analyse der experimentellen Daten verwendet.

Die hohe Übereinstimmung zwischen den Genomregionen mit Einfluss auf $\Delta^{13}\text{C}_K$, die in den unabhängigen Versuchen Feld, GWH11 und GWH12_opt identifiziert wurden, verdeutlicht die Eignung der Methode SR_BIC, die Genomregionen mit den größten Effekten auf die phänotypische Ausprägung wiederholbar zu identifizieren. Die hohe Konsistenz zwischen der Summe der mittels SR_BIC geschätzten Effekte je IL Linie und den Ergebnissen der Mittelwertvergleiche nach Dunnett (1955) ist zudem ein Indiz für die korrekte Identifikation von Genomregion mit Einfluss auf $\Delta^{13}\text{C}_K$.

5. Ausblick

Die Genotypisierung der Mais IL mit dem MaizeSNP50 BeadChip ermöglichte eine sehr hochauflösende Charakterisierung der genetischen Struktur der IL. Die relativ große Zahl an Donorgenomfragmenten je IL, die in der Entwicklung und Selektion der IL mittels SSR Marker unentdeckt blieben, lässt vermuten, dass in anderen IL, die bisher nicht hochauflösend genotypisiert wurden, die tatsächliche genetische Struktur noch nicht vollständig aufgeklärt ist. Dies impliziert, dass auch die in diesen IL identifizierten Assoziationen zwischen Donorgenomfragmenten und der phänotypischen Ausprägung überprüft werden sollten.

Ein Teil der durch die SNP Genotypisierung zusätzlich detektierten Fragmente beruht womöglich auf strukturellen genomischen Unterschieden zwischen den Eltern der IL und B73. Um diese strukturellen Unterschiede und deren Einfluss auf das vermeintliche Auftreten von Donorgenomfragmenten in der IL zu analysieren wird bereits eine RIL Population aus den IL Eltern erstellt, auf deren Grundlage eine genetische Kartierung ausgewählter SNP Marker durchgeführt wird. Zusammen mit einer Anpassung der physikalischen Positionen der SNP an die B73Refseq_v3 könnte durch die genetische Kartierung die Kollinearität zwischen physikalischer und genetischer Position der SNP Marker überprüft, somit die Anzahl wahrer von falsch lokalisierten Donorgenomfragmenten bestimmt und die Bedeutung von Chromatiden-Interferenz unabhängigen Rekombinationsereignissen in der IL untersucht werden. Diese Erkenntnisse hätten Auswirkungen auf den Entwicklungsprozess von IL und könnten zu dessen Optimierung beitragen, sodass einfacher IL mit tatsächlich nur einem Donorgenomfragment je IL Linie entwickelt werden können.

In IL Linien mit mehr als einem Donorgenomfragment je Linie wird die Identifikation von Genomregionen, die den Phänotyp beeinflussen erschwert. Daher ist die Entwicklung robuster statistischer Methoden notwendig, mit denen verlässlich Assoziationen zwischen Genomregionen und dem Phänotyp geschätzt werden können. In der Mais IL zeigte die Kombination aus schrittweiser Regression mit einem auf BIC basierten Modellvergleich den besten Kompromiss aus Spezifität und Sensitivität und lieferte konsistente Ergebnisse über unabhängige Versuche. Dies ist aber nicht zwangsläufig auf Situationen mit anderen Bedingungen, so z.B. auf IL mit einer anderen LD Struktur, einem anderen Verhältnis von Beobachtungen zu möglichen Prädiktoren, oder auf anders strukturierte Merkmale übertragbar. Durch

eine Diversifizierung der Simulation sowie die Berücksichtigung und Evaluierung weiterer Methoden wie z.B. LASSO (Tibshirani, 1996) oder eine Anpassung der schrittweisen Regression an Situationen mit sehr viel mehr möglichen Prädiktoren als Beobachtungen (An et al., 2008), könnten Methoden identifiziert werden, die eine ähnlich gute Spezifität wie SR_BIC, aber eine verbesserte Sensitivität aufweisen.

Aufgrund der hochauflösend charakterisierten genetischen Struktur der Mais IL konnte demonstriert werden, dass auch in der C₄ Spezies Mais eine genotypische Variation für $\Delta^{13}\text{C}$ besteht und reproduzierbar gemessen werden kann. Welche physiologischen und biochemischen Prozesse der genotypischen Variation in $\Delta^{13}\text{C}$ in C₄-Pflanzen zu Grunde liegen, ist bisher nur sehr wenig verstanden. Die Erkenntnisse aus der Mais IL unterstützen erste experimentelle Ergebnisse, die darauf hindeuten, dass $\Delta^{13}\text{C}$ auch in C₄-Pflanzen zumindest teilweise mit dem Verhältnis zwischen interzellulärer und atmosphärischer Kohlendioxidkonzentration assoziiert ist (Madhavan et al., 1991, Henderson et al., 1992, Henderson et al., 1998, Williams et al., 2001). Da dieser Zusammenhang in C₄-Pflanzen möglicherweise nicht so stark ist wie in C₃-Pflanzen, ist die Beteiligung von zusätzlichen Prozessen in der Ausprägung von $\Delta^{13}\text{C}$ äußerst wahrscheinlich. Im Zusammenhang mit dem von Farquhar (1983) entwickelten theoretischen Modell zu $\Delta^{13}\text{C}$ in C₄-Pflanzen, wird ausdrücklich darauf hingewiesen, dass das theoretische Modell erweitert werden muss, sollte sich herausstellen, dass die Aktivität der Carboanhydrase in den Mesophyllzellen für die CO₂ Fixierung limitierend sein kann. Zusätzlich könnte die Kohlenstoffisotopendiskriminierung durch die RuBisCO, PEPC oder Carboanhydrase auch Genotyp abhängig sein, was ebenso $\Delta^{13}\text{C}$ beeinflussen würde. In C₃-Pflanzen wurde berichtet, dass genotypische Unterschiede in der CO₂ Leitfähigkeit der Mesophyllzellen die photosynthetische Kohlenstoffisotopendiskriminierung beeinflusst (Barbour et al., 2010) und kürzlich wurde berichtet, dass die Blattanatomie einen großen Einfluss auf die CO₂ Leitfähigkeit der Mesophyllzellen hat (Tomás et al., 2013). In C₄-Pflanzen könnten sich daher genotypische Unterschiede der Blattanatomie auf die *leakiness* auswirken, was wiederum $\Delta^{13}\text{C}$ beeinflussen würde. Eine weitere Einflussgröße auf $\Delta^{13}\text{C}$ könnte nach Ubierna et al. (2013) die CO₂ Leitfähigkeit der Bündelscheidenzellen und die photorespiratorische Fraktionierung darstellen. Deren Einfluss könnte insbesondere unter Wachstumsbedingungen mit geringer Lichtintensität oder durch Beschattung, wie es

häufig durch Nachbarpflanzen im Feld erfolgt, zunehmen. Dabei könnten sich genotypische Unterschiede in der Photorespiration auf $\Delta^{13}\text{C}$ niederschlagen. All diese Prozesse könnten zumindest in der Theorie einen Einfluss auf $\Delta^{13}\text{C}$ haben (Caemmerer et al., 2014), und es bedarf weiterer Experimente, um deren tatsächlichen Einfluss auf die intraspezifische genotypische Variation in C_4 -Pflanzen neben den Einflussgrößen *leakiness* und $c_i c_a^{-1}$ zu bewerten. Derartige Experimente wie z.B. zur Gaswechselrate und Photosyntheseparameter verlangen jedoch sehr aufwendige und zeitintensive Messungen unter kontrollierten und sehr homogenen Umweltbedingungen, sodass diese Experimente nur mit einer sehr limitierten Anzahl an Prüfgliedern durchgeführt werden können. Die vier in der vorliegenden Arbeit identifizierten IL Linien, die sich unter optimaler Wasserverfügbarkeit reproduzierbar und signifikant von IL-RE unterscheiden, stellen dabei für weitere physiologische Untersuchungen eine hervorragende Auswahl an Prüfgliedern dar, da sie genetisch sehr ähnlich, phänologisch nahezu gleich und dennoch in $\Delta^{13}\text{C}$ sehr variabel sind. Die mit der Mais IL unter optimaler Wasserverfügbarkeit erarbeiteten Ergebnisse deuten auf die Beteiligung einer hoch heritablen genetischen Determinierung der physiologischen bzw. biochemischen Prozesse hin, die sich auf $\Delta^{13}\text{C}$ niederschlagen. Korrelationen von $\Delta^{13}\text{C}$ mit Merkmalen der Photosynthese bzw. der Transpiration sind ein Hinweis, dass $\Delta^{13}\text{C}$ zumindest in der Mais IL von dem Verhältnis $c_i c_a^{-1}$ beeinflusst wird und somit als indirektes Merkmal für die Selektion auf WUE verwendet werden könnte. Die dabei identifizierten Zielregionen auf den Chromosomen 6 und 7, die mit $\Delta^{13}\text{C}_K$ assoziiert sind, dienen als Startpunkt für die Detektion und funktionelle Charakterisierung von Genen die $\Delta^{13}\text{C}$ in Mais determinieren. Zu diesem Zwecke wurden mittels umfangreicher Rückkreuzungen von IL-RE mit den IL Linien, die signifikante Effekte in $\Delta^{13}\text{C}_K$ zeigten (IL-05, IL-49, IL-80, IL-81), einige vollständig homozygote subIL Linien entwickelt (für IL-80 und IL-81 in Abbildung 18) und weitere subIL befinden sich noch in der Entwicklung. Diese werden in weiteren Experimenten eine Feinkartierung der detektierten Effekte in $\Delta^{13}\text{C}_K$ sowie eine Unterscheidung zwischen pleiotropen Effekten und der Kolokalisation mehrerer unabhängiger Effekte ermöglichen. Die Identifikation der den detektierten Effekten zu Grunde liegenden Gene könnte zudem eine Antwort auf die anteilige Bedeutung der einzelnen physiologischen Prozesse bei der Ausprägung von $\Delta^{13}\text{C}$ in der Mais IL liefern. Zudem wurden Kreuzungen zwischen den IL Linien mit signifikantem Effekt in $\Delta^{13}\text{C}_K$ erstellt und aus den entstandenen Nachkommen werden

Linien selektiert, die jeweils mehrere Donorgenomfragmente mit ausschließlich positiven bzw. ausschließlich negativen Effekten auf $\Delta^{13}\text{C}$ tragen, um für weitere Experimente extrem divergente Linien zu schaffen und um die Bedeutung epistatischer Effekte in der Ausprägung von $\Delta^{13}\text{C}$ zu beleuchten.

Die unter suboptimaler Wasserverfügbarkeit erarbeiteten Ergebnisse bestätigen die Erkenntnisse aus den Versuchen mit optimaler Wasserverfügbarkeit im Hinblick darauf, dass die phänotypische Ausprägung von $\Delta^{13}\text{C}$ auch in der C_4 -Pflanze Mais vom Genotyp beeinflusst wird. Die begrenzte Anzahl an IL Linien, die unter suboptimaler Wasserverfügbarkeit getestet wurden, sowie die Tatsache, dass die Erfassung von $\Delta^{13}\text{C}$ in der IL unter suboptimaler Wasserverfügbarkeit bisher nur im Gewächshaus erfolgen konnte, verdeutlicht die Notwendigkeit weiterer Versuche. Die deutliche Genotyp-Behandlung Interaktion, die Ergebnisse hinsichtlich der Genomregion auf Chromosom 1 mit signifikantem Einfluss auf $\Delta^{13}\text{C}_K$, ASI und AK sowie die Korrelation zwischen $\Delta^{13}\text{C}_K$ und dem trockenstressspezifischen Merkmal BR zeigen einen ausgeprägten Einfluss der Wasserverfügbarkeit auf die Ausprägung von $\Delta^{13}\text{C}_K$. Somit könnte $\Delta^{13}\text{C}_K$ eine stabile Beurteilung der Leistung verschiedener Genotypen unter suboptimaler Wasserverfügbarkeit zulassen. Um diese Hypothese zu überprüfen sind zunächst weitere Versuche mit der gesamten IL unter suboptimaler Wasserverfügbarkeit im Feld notwendig. Außerdem bedarf die Korrelation zwischen $\Delta^{13}\text{C}$ der Inzuchtlinien und $\Delta^{13}\text{C}$ entsprechender Testkreuzungen bzw. deren Kornertrag weiterer Experimente, um die züchterische Eignung von $\Delta^{13}\text{C}$ als indirektes Selektionsmerkmal für WUE beurteilen zu können. Unter Berücksichtigung der dringlichen Notwendigkeit, Sorten mit besserer Anpassung an Wassermangelsituationen zu entwickeln und des teilweise geringen Verständnisses physiologischer und biochemischer Prozesse, die dieser Anpassung dienlich sind, rechtfertigen die Ergebnisse mit der Mais IL, insbesondere die Korrelation von $\Delta^{13}\text{C}_K$ mit dem Ertragsparameter AK, zukünftige Untersuchungen der Anwendbarkeit von $\Delta^{13}\text{C}$ als Selektionsmerkmal in C_4 Spezies und der physiologischen Prozesse, die $\Delta^{13}\text{C}$ zu Grunde liegen.

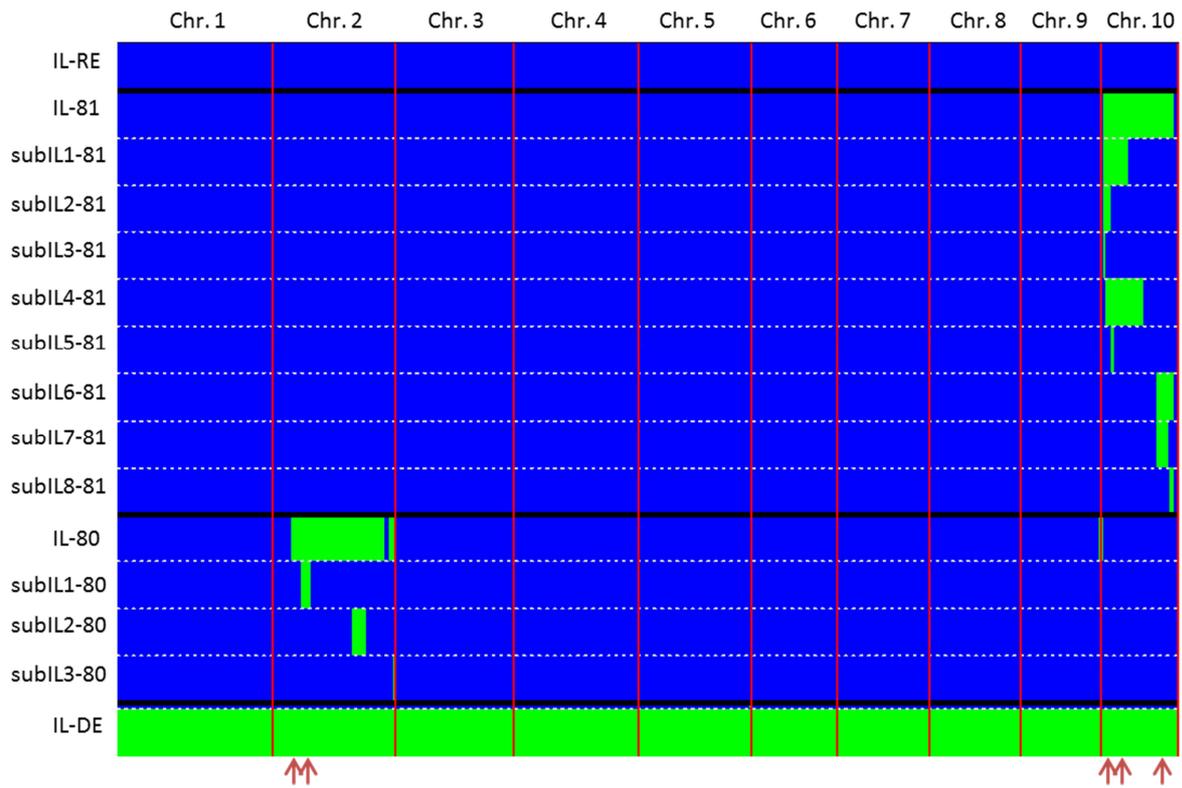


Abbildung 18 Auswahl an bereits vollständig homozygoten sub IL Linien mit zusätzlichen Rekombinationsereignissen innerhalb der jeweiligen Donorgenomfragmente der IL Linien IL-80 und IL-81 für die Verifikation und Feinkartierung der $\Delta^{13}\text{C}_K$ Genomregionen. Die Pfeile deuten die Position der unter optimaler Wasserverfügbarkeit für $\Delta^{13}\text{C}_K$ detektierten und für die Feinkartierung ausgewählten Genomregionen an.

6. Zusammenfassung

Änderungen in der Niederschlagsverteilung und eine damit verbundene Ausweitung der Maisanbaufläche unter künstlicher Bewässerung in Europa rücken die Entwicklung von wassernutzungseffizienten Maissorten in den Fokus der Pflanzenzüchtung. Im Kontext der praktischen Pflanzenzüchtung machen der geringe Durchsatz und die aufwendige Messmethodik klassische physiologische Methoden zur Erfassung phänotypischer Unterschiede in der Wassernutzungseffizienz impraktikabel. Die Diskriminierung von stabilen Kohlenstoffisotopen ($\Delta^{13}\text{C}$) wird in C_3 -Pflanzen aufgrund ihrer engen Korrelation mit der Transpirationseffizienz in physiologischen Studien als indirektes Merkmal für die Wassernutzungseffizienz und in der Pflanzenzüchtung als Selektionsmerkmal für Sorten mit hoher Wassernutzungseffizienz verwendet. Ein direkter Transfer der Ergebnisse aus C_3 - auf C_4 -Pflanzen wird durch die Beteiligung von zusätzlichen Enzymen und die damit verbundene CO_2 Vorfixierung während der C_4 -Photosynthese erschwert. Theoretische Überlegungen, gestützt durch erste experimentelle Ergebnisse, legen jedoch auch in C_4 -Pflanzen einen Zusammenhang von $\Delta^{13}\text{C}$ und der Wassernutzungseffizienz nahe. Um $\Delta^{13}\text{C}$ in der C_4 Spezies Mais generell als Selektionsmerkmal für die Wassernutzungseffizienz in Betracht zu ziehen, muss zunächst geklärt werden, ob ein Teil der phänotypisch beobachteten Variation in $\Delta^{13}\text{C}$ erblich ist, d.h. ob eine genotypische Variation für $\Delta^{13}\text{C}$ in Mais beobachtet werden kann, inwieweit diese Variation von genotypischen Unterschieden in der Pflanzenentwicklung oder Pflanzenphysiologie abhängt, und welche Pflanzenteile am besten geeignet sind, genotypische Unterschiede in $\Delta^{13}\text{C}$ zu erfassen.

Um diese Fragen zu beantworten, wurde eine Introgressionsbibliothek aus zwei genetisch diversen Elite-Inzuchtlinien markergestützt entwickelt und hochauflösend mit 56.110 SNP Markern genotypisiert. Die IL wurde in Feld- und Gewächshaus-Versuchen sowohl unter optimaler als auch unter suboptimaler Wasserverfügbarkeit hinsichtlich $\Delta^{13}\text{C}$ phänotypisiert. Zudem wurden Merkmale der Pflanzenentwicklung und der Pflanzenphysiologie erfasst. Für alle erfassten phänotypischen Merkmale wurde der Anteil der genotypischen Varianz an der phänotypischen Varianz analysiert und die Stabilität der genotypischen Ausprägung über diverse Umwelten untersucht. Um Genomregionen identifizieren zu können, die mit der phänotypischen Ausprägung der erfassten Merkmale assoziiert sind, wurden statistische Methoden

auf Basis einer Simulationsstudie verglichen und hinsichtlich ihrer Spezifität und Sensitivität bewertet. Die Abhängigkeit der $\Delta^{13}\text{C}$ Ausprägung von genotypischen Unterschieden in der Pflanzenentwicklung und Pflanzenphysiologie wurde sowohl auf Ebene von Korrelationen als auch auf Ebene von kolokalisierten Genomregionen mit Einfluss auf mehrere phänotypische Merkmale untersucht.

In allen getesteten Umwelten wurde eine hoch heritable genotypische Variation für $\Delta^{13}\text{C}$ in der IL detektiert. Diese ist in der IL unabhängig von genotypischen Unterschieden in der Pflanzenentwicklung. Mehrere IL Linien zeigten einen signifikanten Unterschied in $\Delta^{13}\text{C}$ zum rekurrenten Elter. Über diverse Umwelten mit optimaler Wasserversorgung war die phänotypische Ausprägung von $\Delta^{13}\text{C}$ stabil und hoch reproduzierbar. Die Detektion von einzelnen Genomregionen mit Einfluss auf die Ausprägung von $\Delta^{13}\text{C}$ ermöglicht erstmals einen Einblick in die genetische Architektur des Merkmals $\Delta^{13}\text{C}$ in einer C_4 Spezies. Unter optimaler Wasserverfügbarkeit wurden, basierend auf 77 IL Linien 22 Genomregionen identifiziert, die signifikant mit $\Delta^{13}\text{C}$ assoziiert waren. Dies deutet auf eine polygene Regulierung der $\Delta^{13}\text{C}$ Ausprägung und auf die Beteiligung mehrerer physiologischer Prozesse hin. Die fünf Genomregionen mit den größten Effekten auf $\Delta^{13}\text{C}$ wurden auf den Chromosomen 1, 2, 6, 7 und 9 lokalisiert und erklärten zusammen 55 % der phänotypischen Variation für $\Delta^{13}\text{C}$. Über Umwelten mit optimaler und suboptimaler Wasserverfügbarkeit wurde eine signifikante Genotyp-Behandlung Interaktion detektiert. Die Übereinstimmung der Linienleistung verglichen mit der Leistung des rekurrenten Elters war über Behandlungen mit unterschiedlicher Wasserverfügbarkeit gering. Dies und die signifikante Korrelation von $\Delta^{13}\text{C}$ mit dem trockenstressspezifischen Merkmal Blattrollen verdeutlichen den Einfluss der Wasserverfügbarkeit auf die Ausprägung von $\Delta^{13}\text{C}$.

Die mit der IL erarbeiteten Erkenntnisse, hinsichtlich der hoch heritablen genotypischen Variation, der Korrelation zwischen $\Delta^{13}\text{C}$ und physiologischen Merkmalen sowie dem Einfluss der Wasserverfügbarkeit auf die $\Delta^{13}\text{C}$ Ausprägung, rechtfertigen zukünftige Untersuchungen der Anwendbarkeit von $\Delta^{13}\text{C}$ als Selektionsmerkmal in C_4 Spezies und der physiologischen Prozesse, die $\Delta^{13}\text{C}$ zu Grunde liegen.

Literaturverzeichnis

- Akaike H** (1974) A new look at the statistical model identification. *IEEE Trans Autom Control* **19**: 716–723
- Ali ML, Sanchez PL, Yu S, Lorieux M, Eizenga GC** (2010) Chromosome segment substitution lines: A powerful tool for the introgression of valuable genes from *Oryza* wild species into cultivated rice (*O. sativa*). *Rice* **3**: 218–234
- Allah AA** (2009) Genetic studies on leaf rolling and some root traits under drought conditions in rice (*Oryza sativa* L.). *Afr J Biotechnol* **8**: 6241–6248
- An H, Huang D, Yao Q, Zhang C-H** (2008) Stepwise searching for feature variables in high-dimensional linear regression. The London School of Economics and Political Science, London, UK
- Araus JL, Amaro T, Casadesús J, Asbati A, Nachit MM** (1998) Relationships between ash content, carbon isotope discrimination and yield in durum wheat. *Funct Plant Biol* **25**: 835–842
- Araus JL, Amaro T, Zuhair Y, Nachit MM** (1997) Effect of leaf structure and water status on carbon isotope discrimination in field-grown durum wheat. *Plant Cell Environ* **20**: 1484–1494
- Araus JL, Sánchez C, Cabrera-Bosquet L** (2010) Is heterosis in maize mediated through better water use? *New Phytol* **187**: 392–406
- Araus JL, Villegas D, Aparicio N, Garcia Del Moral LF, El Hani S, Rharrabti Y, Ferrio JP, Royo C** (2003) Environmental factors determining carbon isotope discrimination and yield in durum wheat under Mediterranean conditions. *Crop Sci* **43**: 170–180
- Ashikari M, Matsuoka M** (2006) Identification, isolation and pyramiding of quantitative trait loci for rice breeding. *Trends Plant Sci* **11**: 344–350
- Ashikari M, Sakakibara H, Lin S, Yamamoto T, Takashi T, Nishimura A, Angeles ER, Qian Q, Kitano H, Matsuoka M** (2005) Cytokinin oxidase regulates rice grain production. *Science* **309**: 741–745
- Bacon MA** (2004) *Water use efficiency in plant*. Blackwell Publishing, UK
- Badeck F, Tcherkez G, Nogués S, Piel C, Ghashghaie J** (2005) Post-photosynthetic fractionation of stable carbon isotopes between plant organs - a widespread phenomenon. *Rapid Commun Mass Spectrom* **19**: 1381–1391
- Bai W, Zhang H, Zhang Z, Teng F, Wang L, Tao Y, Zheng Y** (2010) The evidence for non-additive effect as the main genetic component of plant height and ear height in maize using introgression line populations. *Plant Breed* **129**: 376–384
- Bänzinger M, Edmeades GO, Beck D, Bellon M** (2000) Breeding for drought and nitrogen stress tolerance in maize: From theory to practice. CIMMYT, Mexico
- Barbour MM, Warren CR, Farquhar GD, Forrester G, Brown H** (2010) Variability in mesophyll conductance between barley genotypes, and effects on transpiration efficiency and carbon isotope discrimination. *Plant Cell Environ* **33**: 1176–1185
- Bates D, Maechler M** (2012) lme4: Linear mixed - effects models using S4 - classes. R Package Version 0999999-0
- Bauer E, Falque M, Walter H, Bauland C, Camisan C, Campo L, Meyer N, Ranc N, Rincint R, Schipprack W, et al** (2013) Intraspecific variation of recombination rate in maize. *Genome Biol* **14**: R103
- Beadle GW** (1939) Teosinte and the origin of maize. *J Hered* **30**: 245–247
- Bellasio C, Griffiths H** (2014) Acclimation to low light by C₄ maize: implications for bundle sheath leakiness. *Plant Cell Environ* **37**: 1046–1058
- Bender MM** (1968) Mass spectrometric studies of carbon 13 variations in corn and other grasses. *Radiocarbon* **10**: 468 – 472

- Benjamini Y, Hochberg Y** (1995) Controlling the false discovery rate: A practical and powerful approach to multiple testing. *J R Stat Soc Ser B Methodol* **57**: 289–300
- Bernardo R, Murigneux A, Karaman Z** (1996) Marker-based estimates of identity by descent and alikeness in state among maize inbreds. *Theor Appl Genet* **93**: 262–267
- Bevins MA, Madhavan S, Markwell J** (1993) Two sweetclover (*Melilotus alba* Desr.) mutants temperature sensitive for chlorophyll expression. *Plant Physiol* **103**: 1123–1131
- Bolaños J, Edmeades GO** (1996) The importance of the anthesis-silking interval in breeding for drought tolerance in tropical maize. *Field Crops Res* **48**: 65–80
- Boyer JS** (1996) Advances in drought tolerance in plants. In Donald L. Sparks, ed, *Adv. Agron. Academic Press*, pp 187–218
- Brandes E, Kodama N, Whittaker K, Weston C, Rennenberg H, Keitel C, Adams MA, Gessler A** (2006) Short-term variation in the isotopic composition of organic matter allocated from the leaves to the stem of *Pinus sylvestris*: effects of photosynthetic and postphotosynthetic carbon isotope fractionation. *Glob Change Biol* **12**: 1922–1939
- Brück H, Payne WA, Sattelmacher B** (2000) Effects of phosphorus and water supply on yield, transpirational water-use efficiency, and carbon isotope discrimination of pearl millet. *Crop Sci* **40**: 120–125
- Bunce JA** (2010) Leaf transpiration efficiency of some drought-resistant maize lines. *Crop Sci* **50**: 1409–1413
- Cabrera-Bosquet L, Sánchez C, Araus JL** (2009) How yield relates to ash content, $\Delta^{13}\text{C}$ and $\Delta^{18}\text{O}$ in maize grown under different water regimes. *Ann Bot* **104**: 1207–1216
- Von Caemmerer S, Ghannoum O, Pengelly JLL, Cousins AB** (2014) Carbon isotope discrimination as a tool to explore C_4 photosynthesis. *J Exp Bot* doi: 10.1093/jxb/eru127
- Cernusak LA, Tcherkez G, Keitel C, Cornwell WK, Santiago LS, Knohl A, Barbour MM, Williams DG, Reich PB, Ellsworth DS, et al** (2009) Why are non-photosynthetic tissues generally ^{13}C enriched compared with leaves in C_3 plants? Review and synthesis of current hypotheses. *Funct Plant Biol* **36**: 199–213
- Chen J, Chang SX, Anyia AO** (2012) Quantitative trait loci for water-use efficiency in barley (*Hordeum vulgare* L.) measured by carbon isotope discrimination under rain-fed conditions on the Canadian Prairies. *Theor Appl Genet* **125**: 71–90
- Chen J, Chang SX, Anyia AO** (2011) Gene discovery in cereals through quantitative trait loci and expression analysis in water-use efficiency measured by carbon isotope discrimination. *Plant Cell Environ* **34**: 2009–2023
- Christensen OB, Goodess CM, Harris I, Watkiss P** (2011) European and global climate change projections: Discussion of climate change model outputs, scenarios and uncertainty in the EC RTD climate cost project. *Clim. Proj. Final Rep. Vol. 1 Eur.*
- Churchill GA, Doerge RW** (1994) Empirical threshold values for quantitative trait mapping. *Genetics* **138**: 963–971
- Collister JW, Rieley G, Stern B, Eglinton G, Fry B** (1994) Compound-specific $\delta^{13}\text{C}$ analyses of leaf lipids from plants with differing carbon dioxide metabolisms. *Org Geochem* **21**: 619–627
- Condon AG, Farquhar GD, Rebetzke GJ, Richards RA** (2006) The application of carbon isotope discrimination in cereal improvements for water-limited

- environments. In JM Ribaut, ed, Drought Adapt. Cereals. The Haworth Press Inc., Binghamton UK, pp 171–219
- Condon AG, Richards RA** (1992) Broad sense heritability and genotype × environment interaction for carbon isotope discrimination in field-grown wheat. *Aust J Agric Res* **43**: 921–934
- Condon AG, Richards RA, Rebetzke GJ, Farquhar GD** (2004) Breeding for high water-use efficiency. *J Exp Bot* **55**: 2447–2460
- Condon AG, Richards RA, Rebetzke GJ, Farquhar GD** (2002) Improving intrinsic water-use efficiency and crop yield. *Crop Sci* **42**: 122–131
- Cordell HJ** (2002) Epistasis: what it means, what it doesn't mean, and statistical methods to detect it in humans. *Hum Mol Genet* **11**: 2463–2468
- Crafts-Brandner SJ, Salvucci ME** (2002) Sensitivity of photosynthesis in a C₄ plant, maize, to heat stress. *Plant Physiol* **129**: 1773–1780
- Craig H** (1957) Isotopic standards for carbon and oxygen and correction factors for mass-spectrometric analysis of carbon dioxide. *Geochim Cosmochim Acta* **12**: 133–149
- Craufurd PQ, Austin RB, Acevedo E, Hall MA** (1991) Carbon isotope discrimination and grain-yield in barley. *Field Crops Res* **27**: 301–313
- Dalil B, Ghassemi-Golezani K** (2012) Changes in leaf temperature and grain yield of maize under different levels of irrigation. *Res Crops* **13**: 481–485
- Darwin C** (1876) The effects of cross and self fertilization in the vegetable kingdom. John Murray
- Deepayan S** (2008) Multivariate data visualization with R. Springer, New York
- Dercon G, Clymans E, Diels J, Merckx R, Deckers J** (2006) Differential ¹³C isotopic discrimination in maize at varying water stress and at low to high nitrogen availability. *Plant Soil* **282**: 313–326
- Deutsches Maiskomitee e.V.** Bedeutung des Maisanbaues weltweit. <http://www.maiskomitee.de/web/public/Fakten.aspx/Statistik/Welt> (02.04.2014)
- Diab AA, Kantety RV, Ozturk NZ, Benschel D, Nachit MM, Sorrells ME** (2008) Drought-inducible genes and differentially expressed sequence tags associated with components of drought tolerance in durum wheat. *Sci Res Essay* **1**: 9–26
- Doebley J, Stec A** (1993) Inheritance of the morphological differences between maize and teosinte: comparison of results for two F₂ populations. *Genetics* **134**: 559–570
- Doi K, Iwata N, Yoshimura A** (1997) The construction of chromosome substitution lines of African rice (*Oryza glaberrima* Steud.) in the background of japonica rice (*O. sativa* L.). *Rice Genet Newsl* **14**: 39–41
- Doroszuk A, Snoek LB, Fradin E, Riksen J, Kammenga J** (2009) A genome-wide library of CB4856/N2 introgression lines of *Caenorhabditis elegans*. *Nucleic Acids Res* **37**: e110
- Dunnett CW** (1955) A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control. *J Am Stat Assoc* **50**: 1096–1121
- Ebitani T, Takeuchi Y, Nonoue Y, Yamamoto T, Takeuchi K, Yano M** (2005) Construction and evaluation of chromosome segment substitution lines carrying overlapping chromosome segments of indica rice cultivar “Kasalath” in a genetic background of japonica elite cultivar “Koshihikari.” *Breed Sci* **55**: 65–73
- Edgerton MD** (2009) Increasing crop productivity to meet global needs for feed, food, and fuel. *Plant Physiol* **149**: 7–13

- Eduardo I, Arús P, Monforte AJ** (2005) Development of a genomic library of near isogenic lines (NILs) in melon (*Cucumis melo* L.) from the exotic accession PI161375. *Theor Appl Genet* **112**: 139–148
- Eduardo I, Arús P, Monforte AJ, Obando J, Fernández-Trujillo JP, Martínez JA, Alarcón AL, María Álvarez J, van der Knaap E** (2007) Estimating the genetic architecture of fruit quality traits in melon using a genomic library of near isogenic lines. *J Am Soc Hortic Sci* **132**: 80–89
- Ehdaie B, Hall AE, Farquhar GD, Nguyen HT, Waines JG** (1991) Water-use efficiency and carbon isotope discrimination in wheat. *Crop Sci* **31**: 1282–1288
- Ehleringer JR, Monson RK** (1993) Evolutionary and ecological aspects of photosynthetic pathway variation. *Annu Rev Ecol Syst* **24**: 411–439
- Ehleringer JR, Sage RF, Flanagan L, Pearcy RW** (1991) Climate change and the evolution of C₄ photosynthesis. *Trends Ecol Evol* **6**: 95–99
- Ellis RP, Forster BP, Gordon DC, Handley LL, Keith RP, Lawrence P, Meyer R, Powell W, Robinson D, Scrimgeour CM, et al** (2002) Phenotype/genotype associations for yield and salt tolerance in a barley mapping population segregating for two dwarfing genes. *J Exp Bot* **53**: 1163–1176
- Eshed Y, Gera G, Zamir D** (1996) A genome-wide search for wild-species alleles that increase horticultural yield of processing tomatoes. *Theor Appl Genet* **93**: 877–886
- Eshed Y, Zamir D** (1995) An introgression line population of *Lycopersicon pennellii* in the cultivated tomato enables the identification and fine Mapping of yield-associated QTL. *Genetics* **141**: 1147–1162
- Eshed Y, Zamir D** (1994) A genomic library of *Lycopersicon pennellii* in *L. esculentum*: A tool for fine mapping of genes. *Euphytica* **79**: 175–179
- Eurostat** (2007) *Statistics Explained*. (http://epp.eurostat.ec.europa.eu/statistics_explained/) (01.04.2014)
- Falke KC, Frisch M** (2011) Power and false-positive rate in QTL detection with near-isogenic line libraries. *Heredity* **106**: 576–584
- Falke KC, Sušić Z, Hackauf B, Korzun V, Schondelmaier J, Wilde P, Wehling P, Wortmann H, Mank R, Rouppe van der Voort J, et al** (2008) Establishment of introgression libraries in hybrid rye (*Secale cereale* L.) from an Iranian primitive accession as a new tool for rye breeding and genomics. *Theor Appl Genet* **117**: 641–652
- Falke KC, Wilde P, Wortmann H, Geiger HH, Miedaner T** (2009) Identification of genomic regions carrying QTL for agronomic and quality traits in rye (*Secale cereale*) introgression libraries. *Plant Breed* **128**: 615–623
- FAO Statistics Division** (2014) <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor> (16.04.2014)
- Farquhar GD** (1983) On the nature of carbon isotope discrimination in C₄ species. *Funct Plant Biol* **10**: 205–226
- Farquhar GD, Ehleringer JR, Hubick KT** (1989) Carbon isotope discrimination and photosynthesis. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **40**: 503–537
- Farquhar GD, O’Leary MH, Berry JA** (1982) On the relationship between carbon isotope discrimination and the intercellular carbon dioxide concentration in leaves. *Funct Plant Biol* **9**: 121–137
- Farquhar GD, Richards RA** (1984) Isotopic composition of plant carbon correlates with water-use efficiency of wheat genotypes. *Funct Plant Biol* **11**: 539–552
- Fehr WR, Fehr EL, Jessen HJ** (1987) *Principles of cultivar development: Theory and technique*. Macmillan Pub. Co. Inc., New York, USA

- Fischbeck W, Plarre W, Walter S** (1985) Lehrbuch der Züchtung landwirtschaftlicher Kulturpflanzen. Band 2: Spezieller Teil., 2nd ed. Paul Parey, Berlin
- Flint-Garcia SA, Thuillet A-C, Yu J, Pressoir G, Romero SM, Mitchell SE, Doebley J, Kresovich S, Goodman MM, Buckler ES** (2005) Maize association population: a high-resolution platform for quantitative trait locus dissection. *Plant J Cell Mol Biol* **44**: 1054–1064
- Fracheboud Y, Jompuk C, Ribaut JM, Stamp P, Leipner J** (2004) Genetic analysis of cold-tolerance of photosynthesis in maize. *Plant Mol Biol* **56**: 241–253
- Frascaroli E, Schrag TA, Melchinger AE** (2013) Genetic diversity analysis of elite European maize (*Zea mays* L.) inbred lines using AFLP, SSR, and SNP markers reveals ascertainment bias for a subset of SNPs. *Theor Appl Genet* **126**: 133–141
- Fridman E, Carrari F, Liu YS, Fernie AR, Zamir D** (2004) Zooming in on a quantitative trait for tomato yield using interspecific introgressions. *Science* **305**: 1786–1789
- Furbank RT, Hatch MD** (1987) Mechanism of C₄ photosynthesis the size and composition of the inorganic carbon pool in bundle sheath cells. *Plant Physiol* **85**: 958–964
- Galmés J, Conesa MÀ, Ochogavía JM, Perdomo JA, Francis DM, Ribas-Carbó M, Savé R, Flexas J, Medrano H, Cifre J** (2011) Physiological and morphological adaptations in relation to water use efficiency in Mediterranean accessions of *Solanum lycopersicum*. *Plant Cell Environ* **34**: 245–260
- Ganal MW, Durstewitz G, Polley A, Bérard A, Buckler ES, Charcosset A, Clarke JD, Graner EM, Hansen M, Joets J, et al** (2011) A large maize (*Zea mays* L.) SNP genotyping array: Development and germplasm genotyping, and genetic mapping to compare with the B73 reference genome. *PLoS ONE* **6**: e28334
- Garrick DJ, Taylor JF, Fernando RL** (2009) Deregressing estimated breeding values and weighting information for genomic regression analyses. *Genet Sel Evol* **41**: 55
- Gilbert ME, Holbrook NM, Zwieniecki MA, Sadok W, Sinclair TR** (2011a) Field confirmation of genetic variation in soybean transpiration response to vapor pressure deficit and photosynthetic compensation. *Field Crops Res* **124**: 85–92
- Gilbert ME, Zwieniecki MA, Holbrook NM** (2011b) Independent variation in photosynthetic capacity and stomatal conductance leads to differences in intrinsic water use efficiency in 11 soybean genotypes before and during mild drought. *J Exp Bot* **62**: 2875–2887
- Gore MA, Chia JM, Elshire RJ, Sun Q, Ersoz ES, Hurwitz BL, Peiffer JA, McMullen MD, Grills GS, Ross-Ibarra J, et al** (2009) A first-generation haplotype map of maize. *Science* **326**: 1115–1117
- Gowik U, Westhoff P** (2010) The path from C₃ to C₄ photosynthesis. *Plant Physiol* **155**: 56–63
- Gresset S, Westermeier P, Rademacher S, Ouzunova M, Presterl T, Westhoff P, Schön CC** (2014) Stable carbon isotope discrimination is under genetic control in the C₄ species maize with several genomic regions influencing trait expression. *Plant Physiol* **164**: 131–143
- Groh S, González-de-León D, Khairallah MM, Jiang C, Bergvinson D, Bohn M, Hoisington DA, Melchinger AE** (1998) QTL mapping in tropical maize: III. Genomic regions for resistance to *Diatraea spp.* and associated traits in two RIL populations. *Crop Sci* **38**: 1062–1072

- Gronig M** (2004) International stable isotope reference materials. *In* PA de Groot, ed, *Handb. Stable Isot. Anal. Tech.* Elsevier, Amsterdam, pp 880–884
- Grubbs FE** (1950) Sample criteria for testing outlying observations. *Ann Math Stat* **21**: 27–58
- Gur A, Zamir D** (2004) Unused natural variation can lift yield barriers in plant breeding. *PLoS Biol* **2**: 1610–1615
- Hall AE, Richards RA, Condon AG, Wright GC, Farquhar GD** (2010) Carbon isotope discrimination and plant breeding. *In* J Janick, ed, *Plant Breed. Rev.* John Wiley & Sons, Inc., pp 81–113
- Hall AJ, Vilella F, Trapani N, Chimenti C** (1982) The effects of water stress and genotype on the dynamics of pollen-shedding and silking in maize. *Field Crops Res* **5**: 349–363
- Handley LL, Nevo E, Raven JA, Martinez-Carrasco R, Scrimgeour CM, Pakniyat H, Forster BP** (1994) Chromosome 4 controls potential water use efficiency ($\delta^{13}\text{C}$) in barley. *J Exp Bot* **45**: 1661–1663
- Hao W, Zhu M, Gao J, Sun S, Lin H** (2009) Identification of quantitative trait loci for rice quality in a population of chromosome segment substitution lines. *J Integr Plant Biol* **51**: 500–512
- Hatch MD** (1999) C_4 photosynthesis: A historical overview. *In* RF Sage, RK Monson, eds, *C_4 Plant Biol.* Academic Press, San Diego, pp 17–46
- Hatch MD, Agostino A, Jenkins CLD** (1995) Measurement of the leakage of CO_2 from bundle-sheath cells of leaves during C_4 photosynthesis. *Plant Physiol* **108**: 173–181
- Hatch MD, Slack CR** (1966) Photosynthesis by sugar-cane leaves. A new carboxylation reaction and the pathway of sugar formation. *Biochem J* **101**: 103–111
- Hatch MD, Slack CR** (1970) Photosynthetic CO_2 -fixation pathways. *Annu Rev Plant Physiol* **21**: 141–162
- Hausmann NJ, Juenger TE, Sen S, Stowe KA, Dawson TE, Simms EL** (2005) Quantitative trait loci affecting $\delta^{13}\text{C}$ and responses to differential water availability in *Arapidopsis thaliana*. *Evolution* **59**: 81–96
- Hayes JM** (1983) Practice and principles of isotopic measurements in organic geochemistry. *In* WG Meinschein, ed, *Org. Geochem. Contemp. Anc. Sediments.* Great Lakes Section of the Society of Economic Paleontologists and Mineralogists, Bloomington, Indiana, pp 5.1–5.31
- Henderson SA, von Caemmerer S, Farquhar GD, Wade L, Hammer GL** (1998) Correlation between carbon isotope discrimination and transpiration efficiency in lines of the C_4 species *Sorghum bicolor* in the glasshouse and the field. *Funct Plant Biol* **25**: 111–123
- Henderson SA, von Caemmerer S, Farquhar GD** (1992) Short-term measurements of carbon isotope discrimination in several C_4 species. *Funct Plant Biol* **19**: 263–285
- Hill WG, Robertson A** (1968) Linkage disequilibrium in finite populations. *Theor Appl Genet* **38**: 226–231
- Hoerl AE, Kennard RW** (1970) Ridge regression: Biased estimation for nonorthogonal problems. *Technometrics* **12**: 55–67
- Holland JB, Nyquist WE, Cervantes-Martinez CT** (2003) Estimating and interpreting heritability for plant breeding: An update. John Wiley & Sons, Inc., New York
- Hothorn T, Bretz F, Westfal P** (2008) Simultaneous inference in general parametric models. *Biom J* **50**: 346–363

- Howell PM, Lydiate DJ, Marshall DF** (1996) Towards developing intervarietal substitution lines in *Brassica napus* using marker-assisted selection. *Genome* **39**: 348–358
- Hubick KT, Farquhar GD** (1989) Carbon isotope discrimination and the ratio of carbon gained to water lost in barley cultivars. *Plant Cell Env* **12**: 795–804
- Hubick KT, Hammer GL, Farquhar GD, Wade LJ, von Caemmerer S, Henderson SA** (1990) Carbon isotope discrimination varies genetically in C₄ species. *Plant Physiol* **92**: 534–537
- Hubick KT, Shorter R, Farquhar GD** (1988) Heritability and genotype × environment interactions of carbon isotope discrimination and transpiration efficiency in peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Funct Plant Biol* **15**: 799–813
- Hund A, Ruta N, Liedgens M** (2009) Rooting depth and water use efficiency of tropical maize inbred lines, differing in drought tolerance. *Plant Soil* **318**: 311–325
- Impa SM, Nadaradjan S, Boominathan P, Shashidhar G, Bindumadhava H, Sheshshayee MS** (2005) Carbon isotope discrimination accurately reflects variability in WUE measured at a whole plant level in rice. *Crop Sci* **45**: 2517–2522
- International Seed Testing Association** (2009) International rules for seed testing. Basel, Switzerland
- IPAustralia** (2013) Plant Varieties Journal., 26th ed. Australia
- Ishwaran H, Rao J** (2011) Generalized ridge regression: geometry and computational solutions when p is larger than n . Cleveland Clinic and University of Miami, Miami, USA
- Jenkins CLD, Furbank RT, Hatch MD** (1989) Mechanism of C₄ photosynthesis. A model describing the inorganic carbon pool in bundle sheath cells. *Plant Physiol* **91**: 1372–1381
- Jeuken MJW, Lindhout P** (2004) The development of lettuce backcross inbred lines (BILs) for exploitation of the *Lactuca saligna* (wild lettuce) germplasm. *Theor Appl Genet* **109**: 394–401
- Johnson DA, Rumbaugh MD** (1995) Genetic variation and inheritance characteristics for carbon isotope discrimination in alfalfa. *J Range Manag* **48**: 126–131
- Johnson RC** (1993) Carbon isotope discrimination, water relations, and photosynthesis in tall fescue. *Crop Sci* **33**: 169–147
- Jompuk C, Fracheboud Y, Stamp P, Leipner J** (2005) Mapping of quantitative trait loci associated with chilling tolerance in maize (*Zea mays* L.) seedlings grown under field conditions. *J Exp Bot* **56**: 1153–1163
- Jones HG, Serraj R, Loveys BR, Xiong L, Wheaton A, Price AH** (2009) Thermal infrared imaging of crop canopies for the remote diagnosis and quantification of plant responses to water stress in the field. *Funct Plant Biol* **36**: 978–989
- Juenger TE, McKay JK, Hausmann N, Keurentjes JJB, Sen S, Stowe KA, Dawson TE, Simms EL, Richards JH** (2005) Identification and characterization of QTL underlying whole-plant physiology in *Arabidopsis thaliana*: $\delta^{13}\text{C}$, stomatal conductance and transpiration efficiency. *Plant Cell Environ* **28**: 697–708
- Kadioglu A, Terzi R** (2007) A dehydration avoidance mechanism: Leaf rolling. *Bot Rev* **73**: 290–302
- Kadioglu A, Terzi R, Saruhan N, Saglam A** (2012) Current advances in the investigation of leaf rolling caused by biotic and abiotic stress factors. *Plant Sci* **182**: 42–48

- Kapanigowda MH, Payne WA, Rooney LW, Mullet JE** (2012) Transpiration ratio in sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] for increased water-use efficiency and drought tolerance. *J Arid Land Stud* **21**: 175–178
- Kargbo A, Wang C** (2010) Complex traits mapping using introgression lines in pepper (*Capsicum annuum*). *Afr J Agric Res* **8**: 725–731
- Keurentjes JJB, Bentsink L, Alonso-Blanco C, Hanhart CJ, Vries HBD, Effgen S, Vreugdenhil D, Koornneef M** (2007) Development of a near-isogenic line population of *Arabidopsis thaliana* and comparison of mapping power with a recombinant inbred line population. *Genetics* **175**: 891–905
- Khajeh-Hosseini M, Lomholt A, Matthews S** (2009) Mean germination time in the laboratory estimates the relative vigour and field performance of commercial seed lots of maize (*Zea mays* L.). *Seed Sci Technol* **37**: 446–456
- Kim SH, Jeong JH, Nackley LL** (2013) Photosynthetic and transpiration responses to light, CO₂, temperature, and leaf senescence in garlic: Analysis and modeling. *J Am Soc Hortic Sci* **138**: 149–156
- Kirda C, Mohamed AR, Kumarasinghe KS, Montenegro A, Zapata F** (1992) Carbon isotope discrimination at vegetative stage as an indicator of yield and water use efficiency of spring wheat (*Triticum turgidum* L. var. *durum*). *Plant Soil* **147**: 217–223
- Knight JD, Livingston NJ, Van Kessel C** (1994) Carbon isotope discrimination and water-use efficiency of six crops grown under wet and dryland conditions. *Plant Cell Env* **17**: 173–179
- Kortschak HP, Hartt CE, Burr GO** (1965) Carbon dioxide fixation in sugarcane leaves. *Plant Physiol* **40**: 209–213
- Kubásek J, Šetlík J, Dwyer S, Šantrůček J** (2007) Light and growth temperature alter carbon isotope discrimination and estimated bundle sheath leakiness in C₄ grasses and dicots. *Photosynth Res* **91**: 47–58
- Kubo T, Aida Y, Nakamura K, Tsunematsu H, Doi K, Yoshimura A** (2002) Reciprocal chromosome segment substitution series derived from japonica and indica cross of rice (*Oryza sativa* L.). *Breed Sci* **52**: 319–325
- Kümmerlen B, Dauwe S, Schmundt D, Schurr U** (1999) Thermography to measure water relations of plant leaves. *In* B Jähne, H Hauecker, P Geiler, eds, *Handb. Comput. Vis. Appl. Syst. Appl.* Academic Press Inc., Heidelberg, pp 763–781
- L'Hôte D, Serres C, Laissue P, Oulmouden A, Rogel-Gaillard C, Montagutelli X, Vaiman D** (2007) Centimorgan-range one-step mapping of fertility traits using interspecific recombinant congenic mice. *Genetics* **176**: 1907–1921
- Lambers H, Chapin III FS, Pons TL** (2008) *Plant Physiological Ecology*. Springer
- Lamkey KR, Edwards JW** (1999) Quantitative genetics of heterosis. *In* JG Coors, S Pandey, eds, *Genet. Exploit. Heterosis Crops*. American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, and Soil Science Society of America, Madison, pp 31–48
- Lander ES, Botstein D** (1989) Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics* **121**: 185–199
- Larièpe A, Mangin B, Jasson S, Combes V, Dumas F, Jamin P, Lariagon C, Jolivot D, Madur D, Fiévet J, et al** (2012) The genetic basis of heterosis: multiparental quantitative trait loci mapping reveals contrasted levels of apparent overdominance among traits of agronomical interest in maize (*Zea mays* L.). *Genetics* **190**: 795–811
- Leegood RC** (2002) C₄ photosynthesis: principles of CO₂ concentration and prospects for its introduction into C₃ plants. *J Exp Bot* **53**: 581–590

- Liang Y-K, Xie X, Lindsay SE, Wang YB, Masle J, Williamson L, Leyser O, Hetherington AM** (2010) Cell wall composition contributes to the control of transpiration efficiency in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **64**: 679–686
- Lippman ZB, Semel Y, Zamir D** (2007) An integrated view of quantitative trait variation using tomato interspecific introgression lines. *Curr Opin Genet Dev* **17**: 545–552
- Lippman ZB, Zamir D** (2007) Heterosis: revisiting the magic. *Trends Genet* **23**: 60–66
- Lisec J, Meyer RC, Steinfath M, Redestig H, Becher M, Witucka-Wall H, Fiehn O, Törjék O, Selbig J, Altmann T, et al** (2008) Identification of metabolic and biomass QTL in *Arabidopsis thaliana* in a parallel analysis of RIL and IL populations. *Plant J* **53**: 960–972
- Liu S, Zhou R, Dong Y, Li P, Jia J** (2006) Development, utilization of introgression lines using a synthetic wheat as donor. *Theor Appl Genet* **112**: 1360–1373
- Liu Y, Subhash C, Yan J, Song C, Zhao J, Li J** (2011) Maize leaf temperature responses to drought: Thermal imaging and quantitative trait loci (QTL) mapping. *Environ Exp Bot* **71**: 158–165
- Lopes MS, Araus JL, van Heerden PD, Foyer CH** (2011) Enhancing drought tolerance in C₄ crops. *J Exp Bot* **62**: 3135–3153
- Lu C, Shen L, Tan Z, Xu Y, He P, Chen Y, Zhu L** (1996) Comparative mapping of QTLs for agronomic traits of rice across environments using a doubled haploid population. *Theor Appl Genet* **93**: 1211–1217
- Lü S, Zhao H, Marais DLD, Parsons EP, Wen X, Xu X, Bangarusamy DK, Wang G, Rowland O, Juenger TE, et al** (2012) *Arabidopsis ECERIFERUM9* involvement in cuticle formation and maintenance of plant water status. *Plant Physiol* **159**: 930–944
- Luo ZW, Wu CI, Kearsley MJ** (2002) Precision and high-resolution mapping of quantitative trait loci by use of recurrent selection, backcross or intercross schemes. *Genetics* **161**: 915–929
- Madhavan S** (2012) Leaf chlorophyll levels influence carbon isotope discrimination in soybean and maize. *Int J Biosci Biochem Bioinforma* **2**: 207–211
- Madhavan S, Treichel I, O'Leary MH** (1991) Effects of relative-humidity on carbon isotope fractionation in plants. *Bot Acta* **104**: 292–294
- Mahone GS, Borchardt D, Presterl T, Frisch M** (2012) A comparison of tests for QTL mapping with introgression libraries containing overlapping and nonoverlapping donor segments. *Crop Sci* **52**: 2198–2205
- Mahone GS, Frisch M, Miedaner T, Wilde P, Wortmann H, Falke KC** (2013) Identification of quantitative trait loci in rye introgression lines carrying multiple donor chromosome segments. *Theor Appl Genet* **126**: 49–58
- Martin B, Tauer CG, Lin RK** (1999) Carbon isotope discrimination as a tool to improve water-use efficiency in tomato. *Crop Sci* **39**: 1775–1783
- Martin B, Thorstenson YR** (1988) Stable carbon isotope composition ($\delta^{13}\text{C}$), water use efficiency, and biomass productivity of *Lycopersicon esculentum*, *Lycopersicon pennellii*, and the F1 hybrid. *Plant Physiol* **88**: 213–217
- Martin B, Waldren RP, Stamp DL** (2006) Corn or maize. In D Yarnell, M Rego, eds, *Princ. Field Crop Prod.*, 4th ed. Pearson Education, Upper Saddle River, USA, pp 291–295
- Marzougui S, Sugimoto K, Yamanouchi U, Shimono M, Hoshino T, Hori K, Kobayashi M, Ishiyama K, Yano M** (2011) Mapping and characterization of seed dormancy QTLs using chromosome segment substitution lines in rice. *Theor Appl Genet* **124**: 893–902

- Masle J, Gilmore SR, Farquhar GD** (2005) The *ERECTA* gene regulates plant transpiration efficiency in Arabidopsis. *Nature* **436**: 866–870
- Masuka B, Araus JL, Das B, Sonder K, Cairns JE** (2012) Phenotyping for abiotic stress tolerance in maize. *J Integr Plant Biol* **54**: 238–249
- Matthews RB, Azam-Ali SN, Peacock JM** (1990) Response of four sorghum lines to mid-season drought. II. Leaf characteristics. *Field Crops Res* **25**: 297–308
- Matus I, Corey A, Filichkin T, Hayes PM, Vales MI, Kling J, Riera-Lizarazu O, Sato K, Powell W, Waugh R** (2003) Development and characterization of recombinant chromosome substitution lines (RCSLs) using *Hordeum vulgare* subsp. *spontaneum* as a source of donor alleles in a *Hordeum vulgare* subsp. *vulgare* background. *Genome* **46**: 1010–1023
- McKay JK, Richards JH, Mitchell-Olds T** (2003) Genetics of drought adaptation in *Arabidopsis thaliana*: I. Pleiotropy contributes to genetic correlations among ecological traits. *Mol Ecol* **12**: 1137–1151
- Mei HW, Xu JL, Li ZK, Yu XQ, Guo LB, Wang YP, Ying CS, Luo LJ** (2006) QTLs influencing panicle size detected in two reciprocal introgressive line (IL) populations in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor Appl Genet* **112**: 648–656
- Mejia D** (2003) Maize: Post-harvest operation.
http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/inpho/docs/Post_Harvest_Compendium_-_MAIZE.pdf (02.04.2014)
- Melchinger AE, Piepho HP, Utz HF, Muminovic J, Wegenast T, Torjek O, Altmann T, Kusterer B** (2007) Genetic basis of heterosis for growth-related traits in Arabidopsis investigated by testcross progenies of near-isogenic lines reveals a significant role of epistasis. *Genetics* **177**: 1827–1837
- Merah O, Deléens E, Souyris I, Nachit M, Monneveux P** (2001) Stability of carbon isotope discrimination and grain yield in durum wheat. *Crop Sci* **41**: 677–681
- Miedaner T** (2010) Grundlagen der Pflanzenzüchtung. DLG-Verl., Frankfurt, M.
- Ming Z, Wen I, Ishill R, Li C** (2006) Genotypic differences in photosynthesis and dynamic characteristics of *NPQ* in maize. *Asian J Plant Sci* **5**: 709–712
- Molden D** (2007) Water for Food, Water for Life: A Comprehensive Assessment of Water Management in Agriculture. Earthscan, and Colombo: International Water Management Institute, London
- Monneveux P, Reynolds MP, Trethowan R, González-Santoyo H, Peña RJ, Zapata F** (2005) Relationship between grain yield and carbon isotope discrimination in bread wheat under four water regimes. *Eur J Agron* **22**: 231–242
- Monneveux P, Ribaut JM** (2006) Secondary traits for drought tolerance improvement in cereals. In JM Ribaut, ed, Drought Adapt. Cereals. The Haworth Press Inc., New York, pp 97–143
- Monneveux P, Sheshshayee MS, Akhter J, Ribaut JM** (2007) Using carbon isotope discrimination to select maize (*Zea mays* L.) inbred lines and hybrids for drought tolerance. *Plant Sci* **173**: 390–396
- Morgan JA, LeCain DR** (1991) Leaf gas exchange and related leaf traits among 15 winter wheat genotypes. *Crop Sci* **31**: 443–448
- Nadeau JH, Singer JB, Matin A, Lander ES** (2000) Analysing complex genetic traits with chromosome substitution strains. *Nat Genet* **24**: 221–225
- Neuffer MG, Coe EH** (1974) Corn (Maize). In RC King, ed, Handb. Genet. Springer US, pp 3–30
- Neuwirth E** (2011) RColorBrewer: ColorBrewer palettes.

- Nilson SE, Assmann SM** (2010) The α -subunit of the Arabidopsis heterotrimeric G protein, *GPA1*, is a regulator of transpiration efficiency. *Plant Physiol* **152**: 2067–2077
- O’Leary MH** (1993) Biochemical basis of carbon isotope fractionation. *In* JR Ehleringer, AE Hall, GD Farquhar, eds, *Stable Isot. Plant Carbon-Water Relat.* Academic Press Inc., San Diego USA, pp 19–28
- O’Leary MH** (1981) Carbon isotope fractionation in plants. *Phytochemistry* **20**: 553–567
- O’Leary MH** (1988) Carbon isotopes in photosynthesis. *BioScience* **38**: 328–336
- Ogren WL** (1984) Photorespiration: Pathways, regulation, and modification. *Annu Rev Plant Physiol* **35**: 415–442
- Pandey S, Diallo AO, Islam TMT, Deutsch J** (1986) Progress from selection in eight tropical maize populations using international testing. *Crop Sci* **26**: 879–884
- Panio G, Motzo R, Mastrangelo AM, Marone D, Cattivelli L, Giunta F, De Vita P** (2013) Molecular mapping of stomatal-conductance-related traits in durum wheat (*Triticum turgidum* ssp. *durum*). *Ann Appl Biol* **162**: 258–270
- Pea G, Aung HH, Frascaroli E, Landi P, Pè ME** (2013) Extensive genomic characterization of a set of near-isogenic lines for heterotic QTL in maize (*Zea mays* L.). *BMC Genomics* **14**: 61
- Peleman JD, van der Voort JR** (2003) Breeding by design. *Trends Plant Sci* **8**: 330–334
- Pengelly JJJ, Kwasny S, Bala S, Evans JR, Voznesenskaya EV, Koteyeva NK, Edwards GE, Furbank RT, von Caemmerer S** (2011) Functional analysis of corn husk photosynthesis. *Plant Physiol* **156**: 503–513
- Phillips RL, Kleese RA, Wang SS** (1971) The nucleolus organizer region of maize (*Zea mays* L.): Chromosomal site of DNA complementary to ribosomal RNA. *Chromosoma* **36**: 79–88
- Polley HW** (2002) Implications of atmospheric and climatic change for crop yield and water use efficiency. *Crop Sci* **42**: 131–140
- Price AH** (2006) Believe it or not, QTLs are accurate! *Trends Plant Sci* **11**: 213–216
- Qi H, Huang J, Zheng Q, Huang Y, Shao R, Zhu L, Zhang Z, Qiu F, Zhou G, Zheng Y, et al** (2013) Identification of combining ability loci for five yield-related traits in maize using a set of testcrosses with introgression lines. *Theor Appl Genet* **126**: 369–377
- R Development Core Team** (2012) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria
- Rajabi A, Ober ES, Griffiths H** (2009) Genotypic variation for water use efficiency, carbon isotope discrimination, and potential surrogate measures in sugar beet. *Field Crops Res* **112**: 172–181
- Ramsay LD, Jennings DE, Kearsey MJ, Marshall DF, Bohuon EJR, Arthur AE, Lydiate DJ** (1996) The construction of a substitution library of recombinant backcross lines in *Brassica oleracea* for the precision mapping of quantitative trait loci. *Genome* **39**: 558–567
- Rebetzke GJ, Condon AG, Farquhar GD, Appels R, Richards RA** (2008) Quantitative trait loci for carbon isotope discrimination are repeatable across environments and wheat mapping populations. *Theor Appl Genet* **118**: 123–137
- Reif JC, Kusterer B, Piepho HP, Meyer RC, Altmann T, Schön CC, Melchinger AE** (2009) Unraveling epistasis with triple testcross progenies of near-isogenic lines. *Genetics* **181**: 247–257

- Robinson D, Handley LL, Scrimgeour CM, Gordon DC, Forster BP, Ellis RP** (2000) Using stable isotope natural abundances ($\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{13}\text{C}$) to integrate the stress responses of wild barley (*Hordeum spontaneum* C. Koch.) genotypes. *J Exp Bot* **51**: 41–50
- Ronen G, Carmel-Goren L, Zamir D, Hirschberg J** (2000) An alternative pathway to β -carotene formation in plant chromoplasts discovered by map-based cloning of Beta and old-gold color mutations in tomato. *Proc Natl Acad Sci* **97**: 11102–11107
- Rowland DL, Lamb MC** (2005) The effect of irrigation and genotype on carbon and nitrogen isotope composition in peanut (*Arachis hypogaea* L.) leaf tissue. *Peanut Sci* **32**: 48–56
- Ruget F** (1993) Contribution of storage reserves during grain-filling of maize in Northern European conditions. *Maydica* **38**: 51–59
- Sage RF, Sage TL, Kocacinar F** (2012) Photorespiration and the evolution of C_4 photosynthesis. *Annu Rev Plant Biol* **63**: 19–47
- Saghai-Marouf MA, Soliman KM, Jorgensen RA, Allard RW** (1984) Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. *Proc Natl Acad Sci* **81**: 8014–8018
- Salvi S, Corneti S, Bellotti M, Carraro N, Sanguineti M, Castelletti S, Tuberosa R** (2011) Genetic dissection of maize phenology using an intraspecific introgression library. *BMC Plant Biol* **11**: 4
- Salvi S, Tuberosa R, Chiapparino E, Maccaferri M, Veillet S, van Beuningen L, Isaac P, Edwards K, Phillips RL** (2002) Toward positional cloning of *Vgt1*, a QTL controlling the transition from the vegetative to the reproductive phase in maize. *Plant Mol Biol* **48**: 601–613
- Sánchez-Díaz M, García JL, Antolín MC, Araus JL** (2002) Effects of soil drought and atmospheric humidity on yield, gas exchange, and stable carbon isotope composition of barley. *Photosynthetica* **40**: 415–421
- Sanguineti MC, Tuberosa R, Landi P, Salvi S, Maccaferri M, Casarini E, Conti S** (1999) QTL analysis of drought-related traits and grain yield in relation to genetic variation for leaf abscisic acid concentration in field-grown maize. *J Exp Bot* **50**: 1289–1297
- Saranga Y, Flash I, Paterson AH, Yakir D** (1999) Carbon isotope ratio in cotton varies with growth stage and plant organ. *Plant Sci* **142**: 47–56
- Saranga Y, Menz M, Jiang C-X, Wright RJ, Yakir D, Paterson AH** (2001) Genomic dissection of genotype \times environment interactions conferring adaptation of cotton to arid conditions. *Genome Res* **11**: 1988–1995
- Scartazza A, Lauteri M, Guido MC, Brugnoli E** (1998) Carbon isotope discrimination in leaf and stem sugars, water-use efficiency and mesophyll conductance during different developmental stages in rice subjected to drought. *Funct Plant Biol* **25**: 489–498
- Schläppi M** (2001) RNA levels and activity of *FLOWERING LOCUS C* are modified in mixed genetic backgrounds of *Arabidopsis thaliana*. *Int J Plant Sci* **162**: 527–537
- Schmalenbach I, Korber N, Pillen K** (2008) Selecting a set of wild barley introgression lines and verification of QTL effects for resistance to powdery mildew and leaf rust. *Theor Appl Genet* **117**: 1093–1106
- Schmalenbach I, March TJ, Bringezu T, Waugh R, Pillen K** (2011) High-resolution genotyping of wild barley introgression lines and fine-mapping of the

- threshability locus *thresh-1* using the Illumina GoldenGate assay. *G3* **1**: 187–196
- Schmid ER, Fogy I, Schwarz P** (1978) Beitrag zur Unterscheidung von Gärungsessig und synthetischem Säureessig durch die massenspektrometrische Bestimmung des $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Isotopenverhältnisses. *Z Für Lebensm-Unters Forsch* **166**: 89–92
- Schnable PS, Ware D, Fulton RS, Stein JC, Wei F, Pasternak S, Liang C, Zhang J, Fulton L** (2009) The B73 maize genome: complexity, diversity, and dynamics. *Science* **326**: 1112–1115
- Schön CC, Dhillon BS, Utz HF, Melchinger AE** (2010) High congruency of QTL positions for heterosis of grain yield in three crosses of maize. *Theor Appl Genet* **120**: 321–332
- Schröter D, Cramer W, Leemans R, Prentice IC, Araújo MB, Arnell NW, Bondeau A, Bugmann H, Carter TR, Gracia CA, et al** (2005) Ecosystem service supply and vulnerability to global change in Europe. *Science* **310**: 1333–1337
- Schwarz G** (1978) Estimating the dimension of a model. *Ann Stat* **6**: 461–464
- Semel Y, Nissenbaum J, Menda N, Zinder M, Krieger U, Issman N, Pleban T, Lippman Z, Gur A, Zamir D** (2006) Overdominant quantitative trait loci for yield and fitness in tomato. *Proc Natl Acad Sci* **103**: 12981–12986
- Shao J, Deng X** (2012) Estimation in high-dimensional linear models with deterministic design matrices. *Ann Stat* **40**: 812–831
- Sheldon CC, Rouse DT, Finnegan EJ, Peacock WJ, Dennis ES** (2000) The molecular basis of vernalization: The central role of *FLOWERING LOCUS C* (*FLC*). *Proc Natl Acad Sci* **97**: 3753–3758
- Shim RA, Angeles ER, Ashikari M, Takashi T** (2010) Development and evaluation of *Oryza glaberrima* Steud. chromosome segment substitution lines (CSSLs) in the background of *O. sativa* L. cv. Koshihikari. *Breed Sci* **60**: 613–619
- Shockley KR, Churchill GA** (2006) Gene expression analysis of mouse chromosome substitution strains. *Mamm Genome* **17**: 598–614
- Shull GH** (1908) The composition of a field of maize. *J Hered* **1**: 296–301
- Singer JB, Hill AE, Burrage LC, Olszens KR, Song J, Justice M, O'Brien WE, Conti DV, Witte JS, Lander ES, et al** (2004) Genetic dissection of complex traits with chromosome substitution strains of mice. *Science* **304**: 445–448
- Smith BN, Epstein S** (1971) Two categories of $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ratios for higher plants. *Plant Physiol* **47**: 380–384
- Solomon S, Qin D, Manning M, Chen Z, Marquis M, Averyt KB, Tignor M, Miller HL, eds** (2007) Contribution of working group I to the fourth assessment report of the intergovernmental panel on climate change.
- Springer NM, Ying K, Fu Y, Ji T, Yeh C-T, Jia Y, Wu W, Richmond T, Kitzman J, Rosenbaum H, et al** (2009) Maize inbreds exhibit high levels of copy number variation (CNV) and presence/absence variation (PAV) in genome content. *PLoS Genet* **5**: e1000734
- Strigens A, Freitag NM, Gilbert X, Grieder C, Riedelsheimer C, Schrag TA, Messmer R, Melchinger AE** (2013) Association mapping for chilling tolerance in elite flint and dent maize inbred lines evaluated in growth chamber and field experiments. *Plant Cell Environ* **36**: 1871–1887
- Strosser P, Vall MP, Plötscher E** (1999) Wasser und Landwirtschaft: Beitrag zur Analyse einer wichtigen, aber schwierigen Wechselbeziehung. *Landwirtsch. Umw.*, http://ec.europa.eu/agriculture/envir/report/de/eau_de/report.htm (03.04.2014)

- Stuber CW, Polacco M, Lynn M** (1999) Synergy of empirical breeding, marker-assisted selection, and genomics to increase crop yield potential. *Crop Sci* **39**: 1571–1583
- Susic Z** (2005) Experimental and simulation studies on introgressing genomic segments from exotic into elite germplasm of rye (*Secale cereale* L.) by marker-assisted backcrossing. Universität Hohenheim, Stuttgart-Hohenheim
- Szalma SJ, Hostert BM, LeDeaux JR, Stuber CW, Holland JB** (2007) QTL mapping with near-isogenic lines in maize. *Theor Appl Genet* **114**: 1211–1228
- Takai T, Fukuta Y, Sugimoto A, Shiraiwa T, Horie T** (2006) Mapping of QTLs controlling carbon isotope discrimination in the photosynthetic system using recombinant inbred lines derived from a cross between two different rice (*Oryza sativa* L.) cultivars. *Plant Prod Sci* **9**: 271–280
- Takai T, Ohsumi A, San-oh Y, Laza MRC, Kondo M, Yamamoto T, Yano M** (2009) Detection of a quantitative trait locus controlling carbon isotope discrimination and its contribution to stomatal conductance in japonica rice. *Theor Appl Genet* **118**: 1401–1410
- Tanksley SD** (2004) The genetic, developmental, and molecular bases of fruit size and shape variation in tomato. *Plant Cell* **16**: S181–S189
- Teng F, Zhai L, Liu R, Bai W, Wang L, Huo D, Tao Y, Zheng Y, Zhang Z** (2013) *ZmGA3ox2*, a candidate gene for a major QTL, *qPH3.1*, for plant height in maize. *Plant J* **73**: 405–416
- Teulat B, Merah O, Sirault X, Borries C, Waugh R, This D** (2002) QTLs for grain carbon isotope discrimination in field-grown barley. *Theor Appl Genet* **106**: 118–126
- Tian F, Li DJ, Fu Q, Zhu ZF, Fu YC, Wang XK, Sun CQ** (2005) Construction of introgression lines carrying wild rice (*Oryza rufipogon* Griff.) segments in cultivated rice (*Oryza sativa* L.) background and characterization of introgressed segments associated with yield-related traits. *Theor Appl Genet* **112**: 570–580
- Tibshirani R** (1996) Regression shrinkage and selection via the Lasso. *J R Stat Soc Ser B Methodol* **58**: 267–288
- Tieszen LL, Grant D** (1990) Carbon isotope discrimination among selected Pioneer Hi-Bred and public inbreds and hybrids. *Maize Genet Coop Newslett* **64**: 70
- Tomás M, Flexas J, Copolovici L, Galmés J, Hallik L, Medrano H, Ribas-Carbó M, Tosens T, Vislav V, Niinemets Ü** (2013) Importance of leaf anatomy in determining mesophyll diffusion conductance to CO₂ across species: quantitative limitations and scaling up by models. *J Exp Bot* **64**: 2269–2281
- Törjék O, Meyer RC, Zehnsdorf M, Teltow M, Strompen G, Witucka-Wall H, Blacha A, Altmann T** (2008) Construction and analysis of 2 reciprocal Arabidopsis introgression line populations. *J Hered* **99**: 396–406
- Ubierna N, Sun W, Cousins AB** (2011) The efficiency of C₄ photosynthesis under low light conditions: assumptions and calculations with CO₂ isotope discrimination. *J Exp Bot* **62**: 3119–3134
- Ubierna N, Sun W, Kramer DM, Cousins AB** (2013) The efficiency of C₄ photosynthesis under low light conditions in *Zea mays*, *Miscanthus x giganteus* and *Flaveria bidentis*. *Plant Cell Environ* **36**: 365–381
- Utz HF, Melchinger AE, Schön CC** (2000) Bias and sampling error of the estimated proportion of genotypic variance explained by quantitative trait loci determined from experimental data in maize using cross validation and validation with independent samples. *Genetics* **154**: 1839–1849

- Venables W, Ripley B** (2002) Modern applied statistics with S., 4th ed. Springer, New York
- Vigouroux Y, Glaubitz JC, Matsuoka Y, Goodman MM, Jesus SG, Doebley J** (2008) Population structure and genetic diversity of new world maize races assessed by DNA microsatellites. *Am J Bot* **95**: 1240–1253
- Vladutu C, McLaughlin J, Phillips RL** (1999) Fine mapping and characterization of linked quantitative trait loci involved in the transition of the maize apical meristem from vegetative to generative structures. *Genetics* **153**: 993–1007
- Vogel JC** (1980) Fractionation of carbon isotopes during photosynthesis. Springer, Berlin
- Vos J, Groenwold J** (1989) Genetic differences in water-use efficiency, stomatal conductance and carbon isotope fractionation in potato. *Potato Res* **32**: 113–121
- Wallace JS** (2000) Increasing agricultural water use efficiency to meet future food production. *Agric Ecosyst Environ* **82**: 105–119
- Wang J, Wan X, Crossa J, Crouch J, Weng J, Zhai H, Wan J** (2006) QTL mapping of grain length in rice (*Oryza sativa* L.) using chromosome segment substitution lines. *Genet Res* **88**: 93–104
- Wang L, Zhao Y, Xue Y, Zhang Z, Zheng Y, Chen J** (2007) Development and evaluation of two link-up single segment introgression lines in *Zea mays*. *Acta Agron Sin* **33**: 663–668
- Wang Z-H, Zhang D, Bai Y, Zhang Y-H, Liu Y, Wu Y, Lin X-Y, Wen J-W, Xu C-M, Li L-F, et al** (2013) Genomewide variation in an introgression line of rice-*Zizania* revealed by whole-genome re-sequencing. *PLoS ONE* **8**: e74479
- Wickman FE** (1952) Variations in the relative abundance of the carbon isotopes in plants. *Geochim Cosmochim Acta* **2**: 243–254
- Williams DG, Gempko V, Fravolini A, Leavitt SW, Wall GW, Kimball BA, Pinter PJ, LaMorte R, Ottman M** (2001) Carbon isotope discrimination by *Sorghum bicolor* under CO₂ enrichment and drought. *New Phytol* **150**: 285–293
- Wimmer V, Albrecht T, Auinger HJ, Schön CC** (2012) Synbreed: a framework for the analysis of genomic prediction data using R. *Bioinformatics* **28**: 2086–2087
- Wimmer V, Lehermeier C, Albrecht T, Auinger HJ, Wang Y, Schön CC** (2013) Genome-wide prediction of traits with different genetic architecture through efficient variable selection. *Genetics* **195**: 573–587
- Wright GC, Hubick KT, Farquhar GD** (1988) Discrimination in carbon isotopes of leaves correlates with water-use efficiency of field-grown peanut cultivars. *Funct Plant Biol* **15**: 815–825
- Wu X, Chang X, Jing R** (2011) Genetic analysis of carbon isotope discrimination and its relation to yield in a wheat doubled haploid population. *J Integr Plant Biol* **53**: 719–730
- Xu X, Martin B, Comstock JP, Vision TJ, Tauer CG, Zhao B, Pausch RC, Knapp S** (2008) Fine mapping a QTL for carbon isotope composition in tomato. *Theor Appl Genet* **117**: 221–233
- Xu Y, This D, Pausch R, Vonhof W, Coburn J, Comstock JP, McCouch S** (2009) Leaf-level water use efficiency determined by carbon isotope discrimination in rice seedlings: genetic variation associated with population structure and QTL mapping. *Theor Appl Genet* **118**: 1065–1081
- Xue Q, Zhu Z, Musick JT, Stewart BA, Dusek DA** (2006) Physiological mechanisms contributing to the increased water-use efficiency in winter wheat under deficit irrigation. *J Plant Physiol* **163**: 154–164

- Zamir D** (2001) Improving plant breeding with exotic genetic libraries. *Nat Rev Genet* **2**: 983–989
- Zegada-Lizarazu W, Iijima M** (2005) Deep root water uptake ability and water use efficiency of pearl millet in comparison to other millet species. *Plant Prod Sci* **8**: 454–460
- Zeng ZB** (1994) Precision mapping of quantitative trait loci. *Genetics* **136**: 1457–1468
- Zheng TQ, Xu JL, Li ZK, Zhai HQ, Wan JM** (2007) Genomic regions associated with milling quality and grain shape identified in a set of random introgression lines of rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Breed* **126**: 158–163
- Zhu S, Rosnagel BG, Kaeppler HF** (2004) Genetic analysis of quantitative trait loci for groat protein and oil content in oat. *Crop Sci* **44**: 254–260

Anhang

Tabelle A 1 Ergebnisse der Simulationsstudie bezüglich der durchschnittlichen der Anzahl detektierter Effekte, Sensitivität (S_n), Spezifität (S_p), sowie die zugehörigen 2,5 % und 97,5 % Quantilen, ebenso wie der Anteil an durchschnittlich detektierten QTL mit größtem simuliertem Effekt (QTL^M) für die zwei simulierten Szenarien in Abhängigkeit von der Heritabilität (h^2).

h^2	stat. Verfahren	Nr. detektierter Effekte		Szenario 1				Szenario 2						
		mittel		S_n		S_p		S_n		S_p		QTL^M		
		2,5 %	97,5 %	mittel	mittel	mittel	mittel	mittel	mittel	mittel	mittel			
0,2	SMR	14,17		0,18		0,92		0,87		0,42		0,93		3,00
		3,00	28,00	0,00	0,40	0,84	0,99		0,00	1,00	0,87	0,99		
	SMR_BK	2,38		0,07		0,99		0,49		0,14		0,99		3,00
		1,00	7,00	0,00	0,20	0,97	1,00		0,00	0,50	0,98	1,00		
	SR_AIC	51,95		0,31		0,70		1,13		0,78		0,72		3,00
		19,98	72,00	0,00	0,60	0,57	0,89		0,30	1,00	0,61	0,91		
0,4	SMR	21,48		0,34		0,89		1,44		0,73		0,91		3,00
		6,00	38,00	0,00	0,60	0,79	0,97		0,20	1,00	0,82	0,98		
	SMR_BK	3,80		0,11		0,98		0,67		0,24		0,99		3,00
		1,00	11,00	0,00	0,30	0,95	1,00		0,00	0,60	0,97	1,00		
	SR_AIC	52,74		0,32		0,69		1,16		0,82		0,72		3,00
		23,00	73,00	0,10	0,60	0,57	0,87		0,30	1,00	0,61	0,89		
0,6	SMR	28,18		0,29		0,77		1,17		0,64		0,80		3,00
		1,00	18,00	0,00	0,30	0,90	0,99		0,00	0,50	0,91	0,99		
	SMR_BK	28,18		0,29		0,77		1,17		0,64		0,80		3,00
		0,00	94,03	0,00	0,70	0,41	0,99		0,00	1,00	0,45	0,99		
	SR_AIC	21,48		0,34		0,89		1,44		0,73		0,91		3,00
		6,00	38,00	0,00	0,60	0,79	0,97		0,20	1,00	0,82	0,98		
0,8	SMR	3,80		0,11		0,98		0,67		0,24		0,99		3,00
		1,00	11,00	0,00	0,30	0,95	1,00		0,00	0,60	0,97	1,00		
	SMR_BK	52,74		0,32		0,69		1,16		0,82		0,72		3,00
		23,00	73,00	0,10	0,60	0,57	0,87		0,30	1,00	0,61	0,89		
	SR_AIC	8,87		0,14		0,95		0,67		0,27		0,96		3,00
		2,00	19,00	0,00	0,40	0,89	0,99		0,00	0,60	0,90	0,99		
1,0	SMR	66,06		0,56		0,60		1,93		0,93		0,63		3,00
		0,00	116,00	0,20	0,90	0,331	0,96		0,20	1,00	0,36	0,97		
	SMR_BK	21,48		0,34		0,89		1,44		0,73		0,91		3,00
		6,00	38,00	0,00	0,60	0,79	0,97		0,20	1,00	0,82	0,98		
	SR_AIC	3,80		0,11		0,98		0,67		0,24		0,99		3,00
		1,00	11,00	0,00	0,30	0,95	1,00		0,00	0,60	0,97	1,00		

h^2 ; simulierte Heritabilität, stat. Verfahren; statistische Verfahren, Nr.; Anzahl, 2,5 % bzw. 97,5 % Quantil, S_n ; Sensitivität, S_p , Spezifität, QTL^M , die drei QTL mit größtem Effekt

Tabelle A 1 Fortsetzung

h ²	stat. Verfahren	Nr. detektierter Effekte		Szenario 1				Szenario 2						
		mittel		S _n		S _p		S _n		S _p		QTL ^M		
		2,5%	97,5%	2,5%	97,5%	2,5%	97,5%	2,5%	97,5%	2,5%	97,5%	mittel		
0,6	SMR	27,66		0,41		0,85		1,82		0,87		0,88		3,00
		14,00	46,00	0,10	0,70	0,75	0,93		0,40	1,00	0,78	0,96		
	SMR_BK	6,36		0,17		0,97		0,98		0,35		0,98		3,00
		1,00	14,00	0,00	0,40	0,93	1,00		0,00	0,70	0,95	1,00		
	SR_AIC	53,73		0,32		0,69		1,33		0,80		0,71		3,00
		24,00	73,00	0,10	0,60	0,57	0,87		0,30	1,00	0,60	0,88		
0,8	SMR	10,12		0,19		0,95		1,01		0,34		0,96		3,00
		3,00	24,00	0,00	0,40	0,87	0,99		0,10	0,70	0,89	0,99		
	SMR_BK	77,12		0,58		0,54		2,26		0,96		0,58		3,00
		4,98	123,03	0,20	0,90	0,27	0,94		0,40	1,00	0,32	0,95		
	SR_AIC	31,24		0,51		0,84		2,29		0,94		0,87		3,00
		16,00	47,00	0,20	0,80	0,74	0,92		0,60	1,00	0,78	0,95		
0,9	SMR	8,11		0,23		0,96		1,37		0,47		0,98		3,00
		2,00	17,00	0,00	0,50	0,92	0,99		0,10	1,00	0,94	1,00		
	SMR_BK	55,69		0,51		0,68		2,02		0,94		0,71		3,00
		28,98	74,00	0,20	0,80	0,57	0,85		0,60	1,00	0,61	0,87		
	SR_AIC	13,19		0,39		0,94		1,86		0,59		0,95		3,00
		6,00	27,00	0,10	0,70	0,86	0,98		0,30	1,00	0,88	0,99		
0,9	SMR	103,59		0,73		0,38		2,55		1,00		0,43		3,00
		63,00	131,03	0,40	1,00	0,22	0,64		1,00	1,00	0,27	0,67		
	SMR	34,38		0,48		0,82		2,35		0,94		0,85		3,00
		20,00	50,00	0,20	0,80	0,72	0,89		0,60	1,00	0,76	0,92		
	SMR_BK	11,31		0,23		0,94		1,53		0,51		0,96		3,00
		3,00	19,00	0,00	0,40	0,90	0,99		0,20	0,90	0,92	1,00		
0,9	SMR	56,06		0,52		0,68		2,18		0,93		0,71		3,00
		31,00	74,00	0,20	0,80	0,57	0,84		0,60	1,00	0,61	0,87		
	SMR_BK	15,35		0,46		0,93		2,11		0,65		0,94		3,00
		8,00	32,00	0,20	0,70	0,84	0,98		0,30	1,00	0,86	0,99		
	SR_AIC	112,52		0,74		0,33		2,53		1,00		0,37		3,00
		83,00	135,02	0,50	0,90	0,18	0,52		1,00	1,00	0,24	0,56		

Tabelle A 2 Zielregionen, welche mit Zeit bis zur weiblichen Blüte (BLW), Zeit bis zur männlichen Blüte (BLM), Wuchshöhe (WH), Chlorophyllgehalt des Kolbenblattes (SPAD) über Feld und Gewächshaus 2011 (GWH11), sowie Keimlingstriebkraft (GV) in Klimakammern, der Anzahl Körner je Pflanze (AK) im Feld und der Isotopendiskriminierung gemessen in Kolbenblättern ($\Delta^{13}\text{C}_\text{B}$) in GWH11 assoziiert sind und mittels schrittweisen Regression detektiert wurden.

Merkmal ^a	Ziel-region ID	Chr. ^b	Position der Zielregion ^c [Mb]		Länge der Zielregion [Mb]	ADD ^d	R _i ^{2e}
			Anfang	Ende			
BLW	5	1	36,04	39,28	3,23	0,59	0,06
	9	1	75,20	81,36	6,16	-1,18	0,13
	24	1	254,97	257,03	2,06	0,56	0,04
	26	1	257,97	260,23	2,27	0,71	0,01
	48	2	187,29	204,90	17,61	0,54	0,03
	51	2	214,32	216,39	2,07	0,47	0,02
	76	5	10,68	19,76	9,08	-0,53	0,04
	88	5	206,83	208,78	1,95	0,78	0,10
	96	6	120,84	130,41	9,57	0,70	0,04
	122	8	6,72	8,43	1,70	-0,64	0,05
	133	8	151,28	156,26	4,99	-0,61	0,06
	146	9	16,72	132,74	116,02	0,49	0,02
	160	10	74,91	125,89	50,98	0,77	0,06
BLM	5	1	36,04	39,28	3,23	0,43	0,06
	10	1	81,36	156,35	74,99	-0,68	0,11
	29	1	294,50	297,61	3,11	-0,36	0,03
	54	2	227,75	232,32	4,57	0,38	0,03
	128	8	74,35	78,88	4,53	-0,66	0,02
	129	8	78,88	119,48	40,60	0,99	0,05
	133	8	151,28	156,26	4,99	-0,81	0,12
WH	6	1	39,28	41,79	2,51	7,44	0,05
	9	1	75,20	81,36	6,16	-12,45	0,10
	59	3	147,33	175,14	27,81	12,11	0,10
	77	5	19,76	58,79	39,03	-13,70	0,13
	147	9	132,74	138,99	6,25	-14,98	0,05

Tabelle A 2 Fortsetzung

Merkmal ^a	Ziel-region ID	Chr. ^b	Position der Zielregion ^c [Mb]		Länge der Zielregion [Mb]	ADD ^d	R _i ^{2 e}
			Anfang	Ende			
SPAD	1	1	4,54	10,19	5,66	-0,43	0,01
	19	1	228,15	230,52	2,36	-0,45	0,01
	24	1	254,97	257,03	2,06	0,99	0,04
	29	1	294,50	297,61	3,11	-0,53	0,01
	32	2	6,56	9,18	2,62	0,37	0,01
	35	2	12,67	19,06	6,40	0,56	0,02
	49	2	204,90	211,90	7,00	-1,32	0,03
	54	2	227,75	232,32	4,57	1,06	0,02
	59	3	147,33	175,14	27,81	1,10	0,05
	70	3	225,23	225,82	0,60	-0,79	0,02
	71	4	15,97	31,62	15,65	-1,06	0,02
	76	5	10,68	19,76	9,08	0,84	0,03
	88	5	206,83	208,78	1,95	-0,77	0,05
	94	6	0,18	3,17	3,17	1,46	0,04
	118	7	139,73	147,08	7,34	0,99	0,05
	123	8	8,43	13,78	5,35	-0,81	0,02
	124	8	13,78	17,60	3,82	1,26	0,04
	128	8	74,35	78,88	4,53	-1,49	0,08
	130	8	119,48	124,17	4,69	0,84	0,02
	133	8	151,28	156,26	4,99	-1,29	0,08
	140	8	168,95	174,25	5,31	-0,95	0,03
	141	9	0,51	6,63	6,63	-0,94	0,01
	142	9	6,63	9,21	2,59	1,36	0,02
	143	9	9,21	11,31	2,10	-1,58	0,05
147	9	132,74	138,99	6,25	-0,75	0,01	
151	9	152,80	153,85	1,05	0,89	0,04	
161	10	125,89	133,15	7,26	-1,41	0,07	
162	10	133,15	135,71	2,55	0,75	0,02	

Tabelle A 2 Fortsetzung

Merkmal ^a	Ziel- region ID	Chr. ^b	Position der Zielregion ^c [Mb]		Länge der Zielregion [Mb]	ADD ^d	R _i ^{2 e}
			Anfang	Ende			
AK	2	1	10,19	17,09	6,89	-41,18	0,04
	6	1	39,28	41,79	2,51	37,71	0,05
	13	1	194,29	195,63	1,33	52,69	0,04
	17	1	224,05	225,97	1,92	-22,43	0,02
	25	1	257,03	257,97	0,93	-47,52	0,05
	41	2	75,31	130,81	55,50	-50,60	0,02
	42	2	130,81	164,87	34,06	57,45	0,04
	44	2	169,79	180,65	10,85	16,79	0,01
	56	2	233,14	236,97	3,83	18,38	0,03
	69	3	219,65	225,23	5,57	49,78	0,03
	70	3	225,22	225,82	0,60	-35,21	0,01
	78	5	58,79	136,08	77,29	63,07	0,10
	100	6	153,00	154,88	1,88	-25,60	0,02
	106	6	160,37	161,96	1,59	61,87	0,13
	107	6	161,96	162,63	0,67	-55,90	0,06
	119	7	147,08	157,47	10,4	28,64	0,01
	122	8	6,72	8,43	1,70	21,56	0,02
	143	9	9,21	11,31	2,10	-25,03	0,02
153	10	0,86	0,45	4,47	32,88	0,02	
155	10	5,23	6,42	1,19	-47,76	0,05	
$\Delta^{13}\text{C}_B$	10	1	81,36	156,35	74,99	-0,17	0,06
	82	5	167,69	168,95	1,26	-0,21	0,05
	94	6	0,00	3,17	3,17	-0,33	0,06

Tabelle A 2 Fortsetzung

Merkmal ^a	Ziel- region ID	Chr. ^b	Position der Zielregion ^c [Mb]		Länge der Zielregion [Mb]	ADD ^d	R _i ^{2e}
			Anfang	Ende			
GV	3	1	17,09	27,72	10,63	-0,09	0,02
	68	3	216,97	219,65	2,68	0,04	0,02
	82	5	167,69	168,95	1,26	0,09	0,04
	89	5	208,78	212,15	3,36	-0,10	0,13
	122	8	6,72	8,43	1,70	0,17	0,11
	123	8	8,43	13,78	5,35	-0,11	0,07
	140	8	168,95	174,25	5,31	-0,10	0,06
	150	9	151,12	152,80	1,68	-0,06	0,02
	156	10	6,42	9,18	2,76	-0,05	0,04

^a Merkmale: BLW; Zeit bis zur weiblichen Blüte [Tagen], BLM; Zeit bis zur männlichen Blüte [Tagen], WH; Wuchshöhe [cm], SPAD; Chlorophyllgehalt des Kolbenblattes, AK; Anzahl Körner je Pflanze, $\Delta^{13}\text{C}_\text{B}$; stabile Kohlenstoffisotopendiskriminierung gemessen in den Kolbenblättern, GV, Keimlingstriebkraft, ^b Chromosom, ^c geschätzte Grenzen der Zielregionen ^d additiver Effekt der Donorallele der jeweiligen Zielregion in Relation zu IL-RE, ^e erklärte Prozent der beobachteten phänotypischen Varianz

Tabelle A 3 Zielregionen, welche mit dem Anthesis-Silking Intervall (ASI), Zeit bis zur weiblichen Blüte (BLW), Zeit bis zur männlichen Blüte (BLM), Blatttemperatur (BT), Chlorophyllgehalt des Kolbenblattes (SPAD), Anzahl Körner je Pflanze (AK) bzw. Wuchshöhe (WH) im Gewächshausversuch 2012 unter optimaler Bewässerung (GWH12_opt) assoziiert sind und mittels schrittweiser Regression detektiert wurden.

Merkmal ^a	Ziel-region ID	Chr. ^b	Position der Zielregion ^c [Mb]		Länge der Zielregion [Mb]	ADD ^d	R _i ^{2e}
			Anfang	Ende			
ASI	3	1	34,29	36,04	1,75	-0,71	0,15
	12	1	194,29	206,66	12,37	0,59	0,07
	25	2	38,97	75,31	36,34	-0,88	0,16
	58	6	153,00	154,88	1,88	0,66	0,09
	70	8	6,72	13,78	7,06	-0,90	0,16
BLW	3	1	34,29	36,04	1,75	-0,96	0,06
	12	1	194,29	206,66	12,37	1,11	0,07
	18	1	251,44	254,97	3,53	0,58	0,03
	24	2	33,20	38,97	5,77	0,74	0,02
	46	4	237,68	239,56	1,88	1,12	0,04
	54	6	120,84	130,41	9,57	3,18	0,31
	55	6	130,41	145,94	15,53	-2,50	0,10
	70	8	6,72	13,78	7,06	-1,97	0,16
BLM	72	8	17,60	74,35	56,75	1,32	0,06
	6	1	41,79	54,13	12,35	2,17	0,14
	25	2	38,97	75,31	36,34	1,24	0,09
	46	4	237,68	239,56	1,88	1,94	0,11
BT	54	6	120,84	130,41	9,57	1,91	0,21
	42	3	211,01	219,65	8,64	0,44	0,25
SPAD	86	10	6,42	9,18	2,76	0,23	0,09
	6	1	41,79	54,13	12,35	-3,00	0,18
	15	1	228,15	230,52	2,36	1,34	0,07
	22	2	6,56	9,18	2,62	1,43	0,11
	53	6	0,00	3,17	3,17	2,21	0,10
	54	6	120,84	130,41	9,57	-1,45	0,08
	72	8	17,60	74,35	56,75	-0,96	0,03
	81	9	0,00	138,99	138,99	-3,32	0,22
	90	10	133,15	135,71	2,55	-0,96	0,05

Tabelle A 3 Fortsetzung

Merkmal ^a	Ziel-region ID	Chr. ^b	Position der Zielregion ^c [Mb]		Länge der Zielregion [Mb]	ADD ^d	R _i ^{2 e}
			Anfang	Ende			
AK	1	1	4,54	10,19	5,66	-23,71	0,06
	29	2	187,29	204,90	17,61	26,46	0,07
	42	3	211,01	219,65	8,64	-23,89	0,08
	46	4	237,68	239,56	1,88	-39,57	0,08
	61	6	161,96	167,44	5,48	-19,45	0,04
	65	7	38,69	54,86	16,17	43,04	0,24
	69	7	157,47	176,14	18,66	23,16	0,05
	84	10	0,00	5,23	5,23	-29,64	0,16
WH	42	3	211,01	219,65	8,64	23,95	0,28

^a Merkmale: ASI; Anthesis-Silking Interval [Tagen], BLW; Zeit bis zur weiblichen Blüte [Tagen], BLM; Zeit bis zur männlichen Blüte [Tagen], BT; Blatttemperatur [°C], SPAD; Chlorophyllgehalt des Kolbenblattes, AK; Anzahl Körner je Pflanze, WH; Wuchshöhe [cm], ^b Chromosom, ^c geschätzte Grenzen der Zielregionen ^d additiver Effekt der Donorallele der jeweiligen Zielregion in Relation zu IL-RE, ^e erklärte Prozent der beobachteten phänotypischen Varianz

Tabelle A 4 Zielregionen, welche mit dem Anthesis-Silking Intervall (ASI), Zeit bis zur weiblichen Blüte (BLW), Zeit bis zur männlichen Blüte (BLM), Chlorophyllgehalt des Kolbenblattes (SPAD) bzw. der Anzahl Körner je Pflanze (AK) im Gewächshausversuch 2012 unter suboptimaler Bewässerung (GWH12_sub), assoziiert sind und mittels schrittweiser Regression detektiert wurden.

Merkmal ^a	Ziel-region ID	Chr. ^b	Position der Zielregion ^c [Mb]		Länge der Zielregion [Mb]	ADD ^d	R _i ² ^e
			Anfang	Ende			
ASI	4	1	36,04	39,28	3,23	-1,40	0,20
	34	2	232,32	233,14	0,82	-0,60	0,05
	46	4	237,68	239,56	1,88	3,11	0,29
	79	8	164,56	166,31	1,75	1,31	0,09
BLW	4	1	36,04	39,28	3,23	-1,70	0,17
	10	1	156,35	182,91	26,56	-1,30	0,08
	46	4	237,68	239,56	1,88	3,99	0,29
	60	6	156,58	161,96	5,38	1,14	0,08
	70	8	6,72	13,78	7,06	-1,05	0,04
	79	8	164,56	166,31	1,75	1,18	0,04
BLM	9	1	81,36	156,35	74,99	-1,32	0,22
	34	2	232,32	233,14	0,82	0,80	0,11
	60	6	156,58	161,96	5,38	0,73	0,07
SPAD	22	2	6,56	9,18	2,62	2,34	0,22
	59	6	154,88	156,58	1,70	2,08	0,18
	81	9	0,00	138,99	138,99	-2,32	0,08
AK	4	1	36,04	39,28	3,23	13,14	0,12
	8	1	75,20	81,36	6,16	23,24	0,43
	16	1	230,52	242,65	12,13	6,74	0,04
	55	6	130,41	145,94	15,53	8,65	0,02
	72	8	17,60	74,35	56,75	-26,88	0,15
	73	8	76,32	119,48	43,16	20,99	0,10

^a Merkmale: ASI; Anthesis-Silking Interval, BLW; Zeit bis zur weiblichen Blüte [Tagen], BLM; Zeit bis zur männlichen Blüte [Tagen], WH; Wuchshöhe [cm], SPAD; Chlorophyllgehalt des Kolbenblattes, AK; Anzahl Körner je Pflanze, ^b Chromosom, ^c geschätzte Grenzen der Zielregionen ^d additiver Effekt der Donorallele der jeweiligen Zielregion in Relation zu IL-RE, ^e erklärte Prozent der beobachteten phänotypischen Varianz

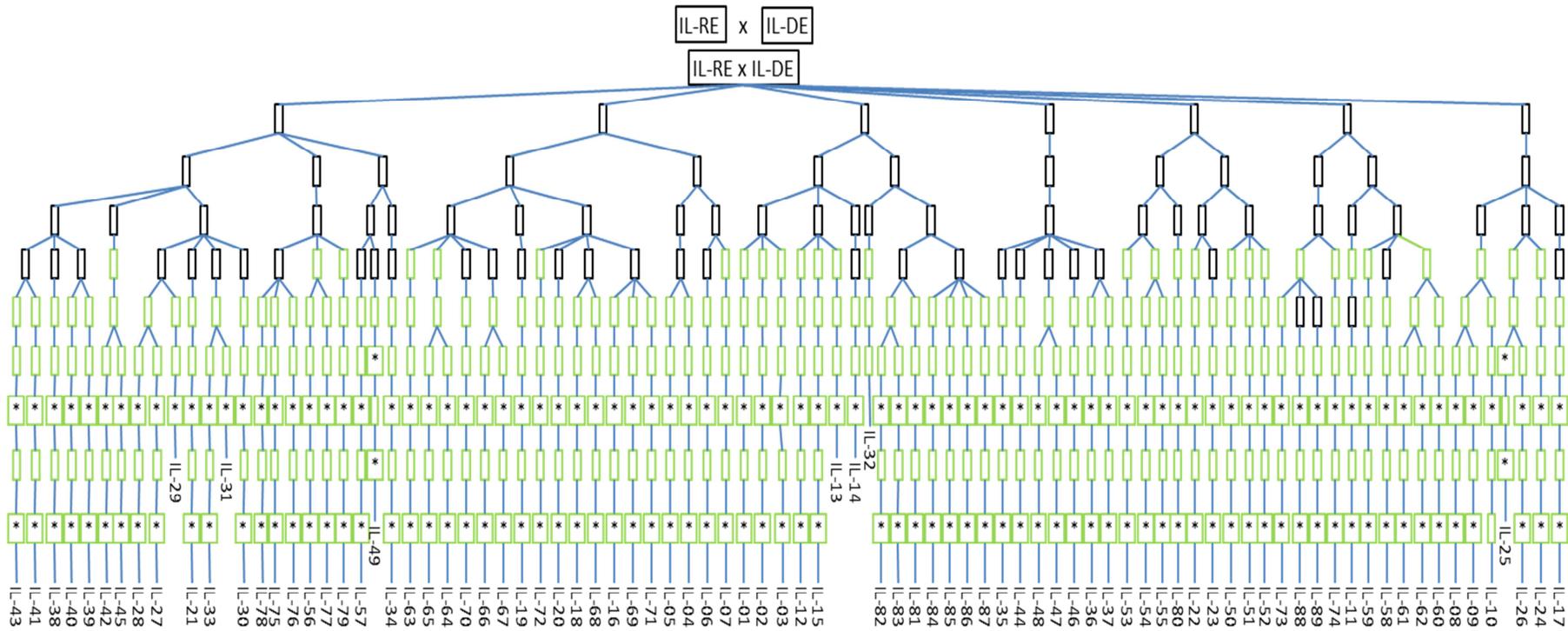


Abbildung A 1 Schematische Darstellung der Entwicklung von 89 IL Linien ausgehend von der F₁-Generation einer Kreuzung der Zahnmaislinie IL-RE und der Hartmaislinie IL-DE. Rechtecke in schwarzer Farbe stellen jeweils die Rückkreuzung einer Einzelpflanze mit IL-RE dar. Rechtecke in grüner Farbe stellen jeweils die Selbstung einer Einzelpflanze dar. Rechtecke mit einem Stern stellen die Selbstung einer ganzen Parzelle (Bulk) dar.

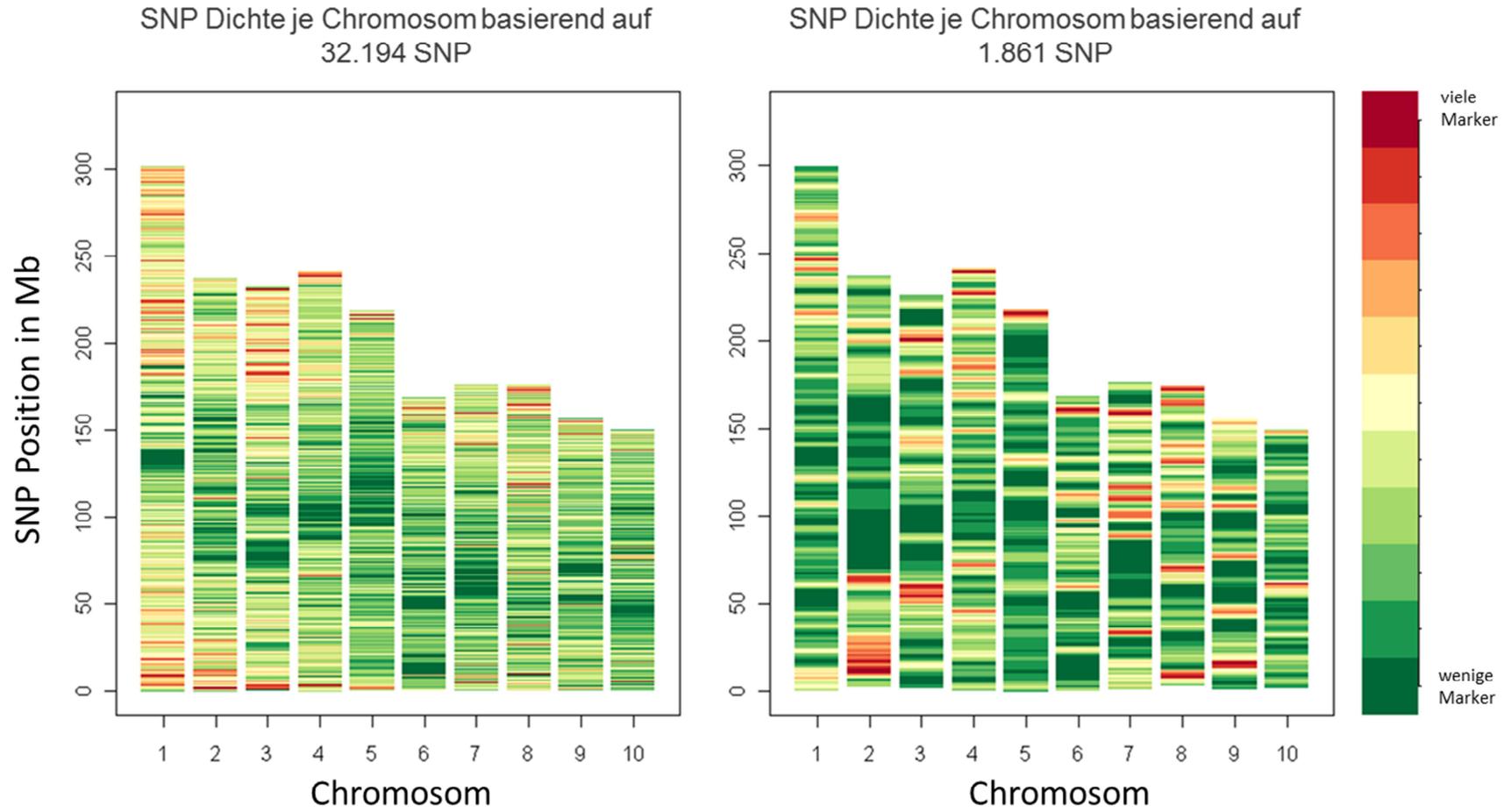


Abbildung A 2 Vergleich der SNP Marker Verteilung mit 32.194 und 1.861 SNP Marker

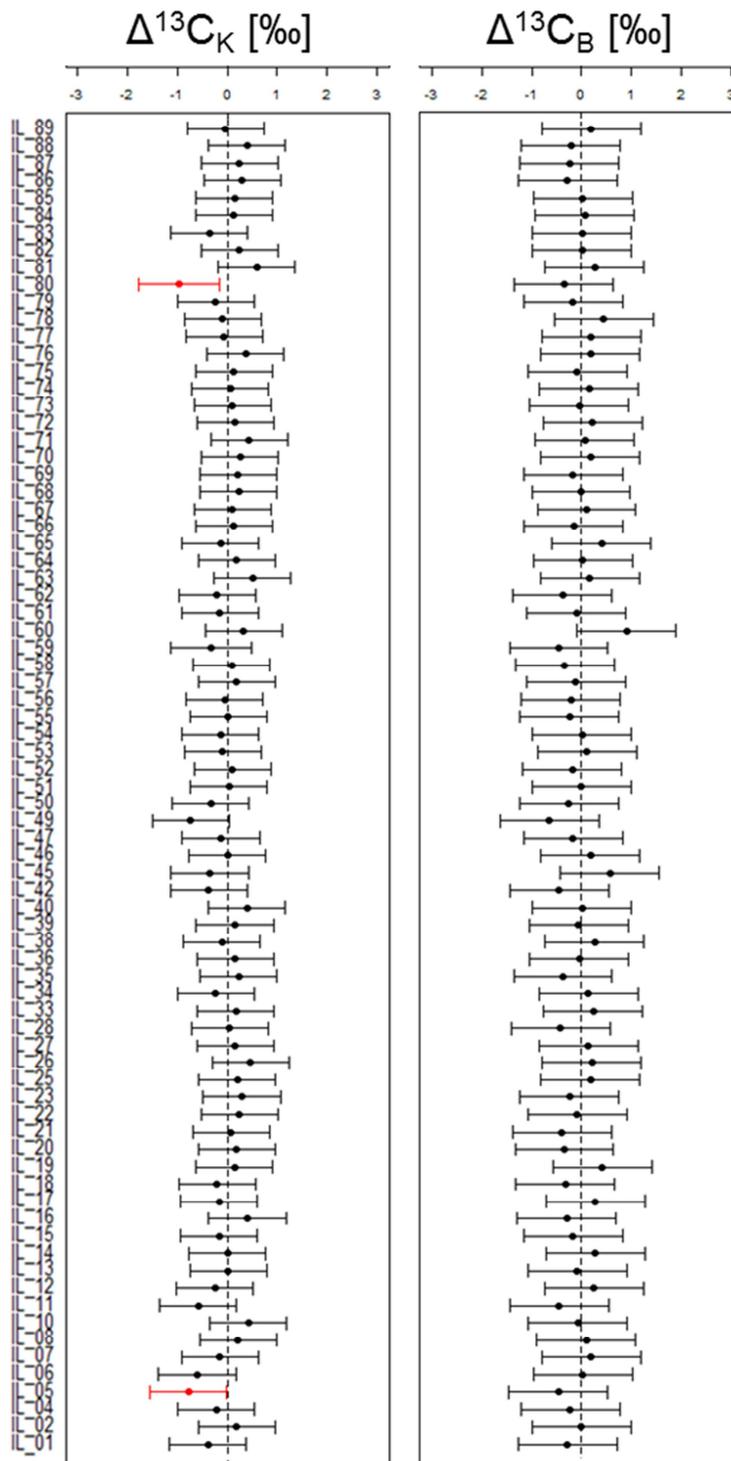


Abbildung A 3 Phänotypische Leistungen der 77 IL Linien für $\Delta^{13}C_K$ und $\Delta^{13}C_B$ im Vergleich zum rekurrenten Elter (vertikal gestrichelte Linie) im Gewächshausversuch 2011 (GWH11). Die horizontalen Linien stellen die jeweiligen Grenzen des 95 % Konfidenzintervalls basierend auf dem Dunnett Test dar. IL Linien welche sich signifikant ($\alpha = 0,05$) in ihrer Leistung von IL-RE unterscheiden sind in rot dargestellt.

Danksagung

Frau Prof. Dr. Chris-Carolin Schön möchte ich an dieser Stelle für die Überlassung des Themas, die sehr gute fachliche Beratung, ihr mir entgegengebrachtes Vertrauen und die Freiheit bei der Ausarbeitung der Arbeit herzlich danken.

Herrn Prof. Dr. Peter Westhoff und Herrn Prof. Dr. Alfons Gierl gilt mein Dank für ihr Mitwirken im Prüfungskomitee.

Herrn Dr. Peter Westermeier und Frau Dr. Svenja Alter gilt mein besonderer Dank für die Betreuung der Arbeit, die angenehme Zusammenarbeit, sowie für ihre wertvollen wissenschaftlichen Anregungen.

Mein Dank gilt Frau Dr. Nicole Krämer und Frau Christina Lehermeier für die kritische Durchsicht des Manuskripts, sowie der gesamten Arbeitsgruppe des LS für Pflanzenzüchtung für die anregende und kollegiale Zusammenarbeit.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Rudi Schäufele vom LS für Grünlandlehre, der sich stets Zeit für konstruktive Diskussionen zur Isotopendiskriminierung nahm und deren Messung erst ermöglichte.

Für ihre engagierte Mithilfe bei der Versuchsdurchführung danke ich Frau Iris Leineweber, Herrn Georg Meier und Herrn Kurt Walter, sowie dem gesamten Team des Gewächshauslaborzentrums Dürnast.

Allen an der praktischen Durchführung der Versuche beteiligten Mitarbeitern, Masteranten, Bacheloranten und Aushilfen gilt mein Dank.

Zudem danke ich der KWS SAAT AG für die sehr gute Zusammenarbeit und die Überlassung des Pflanzenmaterials.

Für die Durchsicht des Manuskripts, ihre Liebe und Geduld danke ich meiner Freundin, Dr. Katharina Kaliebe. Meiner Familie danke ich für ihre liebevolle Unterstützung und ihr Verständnis während meiner Promotionszeit.

Die vorliegende Arbeit wurde durch die finanzielle Unterstützung des Bundesministeriums für Bildung und Forschung teilweise im Rahmen des AgroClustER „Synbreed-Innovationscluster synergistische Pflanzen- und Tierzüchtung“ und „OPTIMAIS-Verbesserung der Biomasse-Syntheseleistung durch züchterische Optimierung des Wassernutzungseffizienz von Energiemais“ ermöglicht.

Lebenslauf

persönliche Daten

Name	Sebastian Gresset
Geburtsdatum	05.03.1983
Geburtsort	München
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch

Schulbildung

1993 – 2000	Werner-Heisenberg Gymnasium, Garching bei München
2000 – 2002	Dom Gymnasium, Freising

Wehrdienst

2002 – 2003	Zentrales Institut der Bundeswehr, München/Straubing
-------------	--

Akademische Ausbildung

2003 – 2003	Studium der klassischen Archäologie, alten Geschichte und italienischen Philologie, Ludwig-Maximilians-Universität München
2003 – 2009	Studium der Agrarwissenschaften Fachrichtung: Pflanzenwissenschaften Technische Universität München-Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt

Berufstätigkeit

2009 - 2014	wissenschaftlicher Angestellter am Lehrstuhl für Pflanzenzüchtung Technische Universität München-Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt
seit 2014	wissenschaftlicher Mitarbeiter Maiszüchtung Biotechnologie, KWS SAAT AG, Einbeck