

Kombination aus *ex-situ* Erhaltung und *on-farm* Management Schweizer Maislandsorten auf Basis einer Kernkollektion

1. Einleitung und Zielsetzungen

Maissorten, die seit über 400 Jahren in der Schweiz angebaut wurden, enthalten eine breite genetische Vielfalt, die für die Entwicklung und Verbesserung zukünftiger Sorten ausschlaggebend sein kann. Dank weitsichtiger Züchter und begeisterter Sammler sind ca. 170 dieser Schweizer Maislandsorten (Akzessionen) erhalten und in die Genbank in Changins eingelagert worden. In einem ersten Ansatz wurde die gesamte Kernkollektion Schweizerischer Maislandsorten anhand von 10 simple-sequence-repeat Markern (SSRs) im Agarose-Gel-Verfahren molekulargenetisch untersucht. Mit den gefundenen Allelfrequenzen wurde die genetische Verwandtschaft der Akzessionen berechnet (Eschholz et al. 2008).

Darauf basierend wurde eine Untergruppe von Akzessionen (Subset, Kernkollektion) bestimmt, welche 95% der molekulargenetischen Diversität der gesamten Sammlung abdeckt. Bei der Auswahl der Kernkollektion wurden nicht nur die Markerdaten, sondern auch phänotypische Merkmale berücksichtigt. Die Kernkollektion ist somit molekulargenetisch und phänotypisch repräsentativ für die gesamte Sammlung. Die Definition einer Kernkollektion vereinfacht das Management der Genbank und ermöglicht detaillierte Untersuchungen, welche für eine gründliche Charakterisierung der Landsorten unabdingbar, doch mit einer grosse Anzahl Akzessionen kaum zu realisieren sind. So können besonders robuste Landsorten leichter identifiziert und für die nachhaltige Nutzung pflanzengenetischer Ressourcen zur Verfügung gestellt werden.

2. Erledigte Arbeiten

2.1 Genetische Charakterisierung der Kernkollektion

Die detaillierte Charakterisierung der Kernkollektion findet wiederum auf genetischer und phänotypischer Ebene statt. Die genetischen Analysen wurden am Internationalen Mais- und Weizenzüchtungszentrum (CIMMYT) in Mexiko durchgeführt. Sie beruhten auf einer neueren, präziseren und international anerkannten Technik für Verwandtschaftsstudien (Dubreuil et al. 2006), dank derer die Schweizer Kernkollektion in einen internationalen Kontext gestellt werden kann. Zum Beispiel kann so die Abstammung der Landsorten unterschiedlicher Regionen nördlich und südlich der Alpen besser nachvollzogen werden. Selbstverständlich wird auch die genetische Struktur der innerhalb der Kernkollektion verdeutlicht.

Methodik

Ein DNA-Gemisch von jeder Akzession (15 Individuen pro Akzession) wurde mit 35 SSRs analysiert. Die Markerallele wurden in einem Kapillarsequenziergerät auf Polyacrylamidgelen aufgetrennt. Die verwendeten Marker (Tabelle 1 im Anhang) wurden aufgrund ihrer Reproduzierbarkeit, dem hohen Informationsgehalt und wegen ihrer Sequenzbeschaffenheit ausgewählt und haben sich bereits in diversen internationalen Verwandtschaftsstudien bewährt (Warburton et al. 2002, Dubreuil et al. 2006). Mit den bereinigten Rohdaten wurden akzessionspezifische Allelfrequenzen und daraus die genetischen Distanzen zwischen den Akzessionen berechnet (Dubreuil et al. 2006). Reif et al. (2005a) gab eine Übersicht über verschiedene Methoden zur Berechnung genetischer Distanzen. In Anlehnung an das Vorgehen von Reif et al. (2005b) wurden die Euklidische Distanz und die Modified Rogers' Distanz verwendet. In einem letzten Schritt wurden die genetischen Distanzen zwischen den Akzessionen mit Abstammungsbäumen (Dendrogrammen) grafisch dargestellt.

Die Euklidische Distanz wird für die Vergleichbarkeit der vorliegenden Daten mit anderen Studien benötigt, wohingegen die Modified Rogers' Distanz unterschiedliche Entwicklungsgeschwindigkeiten (Mutationen an Markerorten) zulässt. Die Irrtumswahrscheinlichkeit beim Erstellen der Dendrogrammen wurde mit tausendfacher zufälliger Stichprobenauswahl (bootstrapping) und anschliessendem Vergleich der Resultate minimiert. Für einen bestmöglichen Vergleich mit anderen, internationalen Studien wurden weitere charakteristische Kenngrössen der Populationsgenetik (z.B. *F*-Statistik; Weir and Cockerham 1984) berechnet.

Resultate

Die genetische Verwandtschaft der 35 Schweizer Maislandsorten und der Vergleichshybride Magister (MAGI) konnte in guter Übereinstimmung mit geographischem Ursprung und in hoher Auflösung dargestellt werden. Neben den bereits bekannten Gruppen (Cluster) von Akzessionen mit Herkunft nördlich und südlich der Alpen wurden separate Cluster für Walliser Akzessionen und für einige Akzessionen aus der Bodenseeregion identifiziert. Die enge Verwandtschaft

zwischen Landsorten aus der Linthebene (LV) und jenen aus dem Rheintal (RV), weisen auf regen Saatgutaustausch zwischen diesen Regionen hin. Die Kontrollhybride Magister ist enger mit den südlichen Genotypen verwandt. Ihre Position im Dendrogramm liegt zwischen den Walliser und den Tessiner Maislandsorten.

Die Akzessionen der Kernkollektion weisen niedrige, teilweise sogar negative, Inzuchtkoeffizienten auf und somit eine höhere tatsächliche als erwartete Heterozygotie. Dies kann auf eine erfolgreiche Vermehrungsarbeit im Jahr 2007 zurückgeführt werden, bei der offensichtlich kaum Selbstbestäubungen stattfanden. Die mit Selbstbestäubungen einhergehende Reduktion der Diversität innerhalb einzelner Landsorten wäre unerwünscht gewesen. Gegenüber anderen europäischen Studien weist die Kernsammlung Schweizer Maislandsorten eine vergleichsweise geringe genetische Diversität auf.

2.2 Felderhebungen 2008

Die meist bessere Kühletoleranz in der Jugendentwicklung nördlicher Akzessionen im Vergleich zu südlichen Akzessionen wurde bereits im Projekt der zweiten NAP Phase (Peter et al. 2009) erkannt. Die durch Kühletoleranz bedingte Frühsaatverträglichkeit ist ein entscheidendes Kriterium für den Maisanbau in gemässigten bis kühlen Breiten. Die Kühletoleranz von Mais wird weiterhin züchterisch verbessert.

Kühletoleranz beruht auf mehreren, teils sehr komplexen physiologischen Mechanismen, zum Beispiel auf einem robusten photosynthetischen Apparat. Das Zusammenspiel dieser Mechanismen führt zu einem guten Wachstum der Pflanzen im Frühjahr, welches sich in der Biomasseproduktion widerspiegelt. Chlorophyll-Fluoreszenz-Messungen erwiesen sich als besonders geeignet um die Kühletoleranz des photosynthetischen Apparates von Mais zu beurteilen (Fracheboud et al. 1999).

2.2.1 Frühsaatverträglichkeit und Jugendentwicklung

Die Kernkollektion wurde zusammen mit der Vergleichshybride zu zwei unterschiedlichen Terminen in Lindau/Eschikon (ZH) ausgesät (je drei Wiederholungen). In beiden Versuchen wurden Biomasserhebungen im 3- und 6-Blattstadium durchgeführt. Zuvor wurde der relative Chlorophyllgehalt der Blätter (SPAD), sowie der Chlorophyll-Fluoreszenz-Parameter F_v/F_m gemessen. Letzterer gibt Auskunft über mögliche kühlebedingte Schäden des Photosyntheseapparates und sollte möglichst nach Kälteeinbrüchen gemessen werden.

Allerdings blieben deutliche Kälteeinbrüche während der kritischen Phase der Versuche aus. Die F_v/F_m -Messungen zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Akzessionen, weder im 3-Blatt noch im 6-Blattstadium. Hingegen wurden deutliche Unterschiede im relativen Chlorophyllgehalt der Blätter und in der Sprossbiomasse festgestellt. Das Wachstum einiger Landsorten unter Frühsaatbedingungen war sogar demjenigen der kühletoleranten Kontrollhybride Magister deutlich überlegen (Freitag et al. 2008). Auffallend ist das erneut gute Abschneiden nördlicher Akzessionen.

Auflaufprobleme, sowie Ausfall einer Kontrollparzelle führten dazu, dass die Schlussfolgerungen als Tendenzen, nicht aber als statistisch gesicherte Befunde angesehen werden können. Zeitliche Wachstumsverläufe können anhand von nur zwei Beprobungsterminen schlecht dargestellt werden. Die Daten dienen daher als Momentaufnahme.

Ein dritter Versuch (3 Wiederholungen) zur Jugendentwicklung wurde am Rheinhof in Salez (SG) ausgesät. Eine besonders frühe Aussaat (10.04.2008) sollte die Wahrscheinlichkeit niedriger Temperaturen während der Jugendentwicklung erhöhen. Starke Niederschläge kurz nach der Aussaat verschlammten die Bodenoberfläche. In der darauf folgenden Trockenperiode bildete sich eine harte Kruste an der Bodenoberfläche. Die Pflanzen konnten nur schlecht auflaufen und entwickelten sich dürrig. Weil die Biomassendaten dadurch verzerrt gewesen wären wurde auf eine Beprobung verzichtet.

2.2.2 Phänotypische Charakterisierung der Kernkollektion

Neutrale Merkmale, d.h. Merkmale, die kaum unter dem Einfluss menschlicher Selektion standen, können, trotz enger genetischer Verwandtschaft zwischen verschiedenen Maislandsorten, erheblich variieren. Ziel der phänotypischen Charakterisierung ist es, relativ einfach zu erfassende Merkmale zu finden, mit denen Landsorten oder Landsortentypen unterschieden werden können. Der Nutzen solcher Merkmale für die Unterscheidung von Landsorten kann im Vergleich mit den genetischen Daten bestimmt werden. In anderen Studien wurde für die Beschreibung von genetischen Ressourcen ein zweistufiger Ansatz empfohlen, bestehend aus einer molekulargenetischen Klassifizierung und einer anschliessenden morphologischen Beschreibung der identifizierten Gruppen (Rebourg et al. 2001).

Die Kernkollektion wurde in einem Versuch mit vier Wiederholungen in Lindau/Eschikon (ZH) ausgesät. Im Verlaufe der Vegetationsperiode wurde ein breites Set von morpho-physiologischen Merkmalen erfasst (Tabelle 2). Zudem wurde der Kornertrag und der Ernteindex am Ende der Vegetationsperiode bestimmt. Besonders wüchsige Akzessionen aus dem Rheintal und dem Tessin waren in der Sprossbiomasse auf gleichem Niveau mit dem Vergleichshybriden. Ein

anderes Bild zeichnete sich beim Kornertrag ab: Die Landsorten produzierten deutlich weniger Ertrag als die Hybriden. Unterschiede in der Standfestigkeit, der Bestockungsneigung und in der Anfälligkeit gegenüber Schaderregern trugen wesentlich zu diesen Ergebnissen bei.

Viele der erhobenen morphologischen Merkmale, von welchen etliche für die Beschreibung und Bestimmung von Maissorten verwendet werden (Tabelle 2), zeigten eine grosse Variabilität innerhalb einzelner Akzessionen. Es scheint, dass diese Merkmale nicht geeignet sind um genetisch diverse Landsorten verlässlich zu identifizieren. Allerdings ist zu erwarten, dass bestimmte Merkmale und Merkmalskombinationen eine gewisse Differenzierung der Landsorten zulassen und das Verständnis für den Zusammenhang zwischen genetischer und phänotypischer Variabilität verbessern.

Die Daten werden nach eingehender Analyse in die Nationale Datenbank (BDN) eingespeist.

2.2.3 Pflanzdichteversuch

Ein Grossteil des Ertragszuwachses von Hybridsorten im Laufe der letzten 60 bis 70 Jahre beruht auf einer verbesserter Leistung unter immer höheren Pflanzdichten, welcher eine verbesserte allgemeine Stresstoleranz (Konkurrenz um Licht, Nährstoffe, Wasser) zugrunde liegt (Duvick 2005). Um die Biomasse- und Kornproduktion der Landsorten unter variablen Pflanzdichten mit derjenigen von Magister zu vergleichen wurden acht Landsorten unter hoher und niedriger Pflanzdichte (3 und 6.7 Pflanzen m⁻²) ausgesät. Zusammen mit den Resultaten des oben erwähnten Versuchs zur phänotypischen Charakterisierung der Landsorten, sowie mit Resultaten von früheren Versuchen, liegen Daten über Kornertrag und teilweise auch über Biomasseproduktion unter mehreren Pflanzdichten vor.

2.3 Klimakammerversuche 2008

Die Kernkollektion wurde in vier Klimakammerversuchen auf ihre Reaktion auf Kühlestress untersucht. Dazu wurden die Einzelpflanzen in 10 x 10 x 10 cm Töpfen bis zum Zweiblattstadium unter 25/23°C (Tag/Nacht) angezogen und anschliessend bis zum Dreiblattstadium reduzierten Temperaturen (15/13°C) ausgesetzt (Kontrollbedingungen: 25/23°C). Als Ergänzung zu diesem längeren, moderaten Kühlestress wurde in einem weiteren Versuch ein kurzer, starker Stress bei 6°C appliziert. Das Augenmerk der Untersuchungen lag auf Chlorophyll-Fluoreszenz-Parametern und der Biomasseproduktion. Zusätzlich wurde auch der Wachstumsverlauf des dritten Blattes sowie dessen Fläche und spezifische Fläche gemessen.

Die Resultate zeigten eine grosse Variabilität für Kühletoleranz innerhalb der Kernkollektion. Ähnlich wie in den Feldversuchen entwickelten sich die Landsorten nördlicher Herkunft insgesamt besser unter Kühlebedingungen als jene südlicher Herkunft. Allerdings muss dabei beachtet werden, dass die Korngrösse einen wesentlichen Einfluss auf die Biomasseproduktion in frühen Entwicklungsstadien hat. Hingegen bestand kein Zusammenhang zwischen der Toleranz der Photosynthese und der Samengrösse.

Einige Akzessionen entwickelten sich deutlich besser unter Kühlestress als die Referenzhybride Magister. Zu erwähnen sind insbesondere die Akzessionen RV176, RV094 (beide aus dem Rheintal), PR007 (Hinterrheintal) und VS113 (Wallis). Sie besitzen einen besonders kühletoleranten photosynthetischen Apparat – eine Eigenschaft welche auch für die moderne Maiszüchtung von Nutzen sein könnte.

3. Öffentlichkeitsarbeit

Das vorliegende Projekt NAP03-58 konnte im Jahr 2008 an folgenden Anlässen wissenschaftlichem oder nicht-wissenschaftlichem Publikum vorgestellt werden:

- Spezialitätenfest, ZHAW Wädenswil, 13. September 2008. Stand mit Anschauungsmaterial und Postern zur Diversität Schweizer Maislandsorten, zur historischen Migration von Mais, zu den Ergebnissen über die Biomasseleistung unter frühen Aussaatbedingungen und über die Erhaltungsarbeit im Rahmen des NAP.
- Nacht der Forschung, Zürich, 26. September 2008. „Die vielen Farben von Mais“ – Charakterisierung Schweizer Maislandsorten. Stand mit Anschauungsmaterial und Poster zur Diversität der Landsorten und zur historischen Migration von Mais.
- Gemeinsame Tagung der Gesellschaft für Pflanzenbauwissenschaften (GPW) und der Gesellschaft für Pflanzenzüchtung (GPZ): „Biodiversität in der Pflanzenproduktion“, Göttingen, 1.-2. Oktober 2008. Posterpräsentation: Freitag et al. 2008: „Charakterisierung Schweizer Maislandsorten“
- Information von Studierenden der ETH Zürich über die effiziente Charakterisierung und nachhaltige Nutzung pflanzengenetischer Ressourcen im Rahmen des Nationalen Aktionsplanes (NAP). (Versuchsstation Eschikon, ZH am 31.10.2008)

4. Publikationen / Schriftliche Arbeiten

- Eschholz et al. (2008) Genetic diversity of Swiss maize assessed with individuals and bulks on agarose gels. *Genetic Resources and Crop Evolution* 55:971-983
- Freitag N, Stamp P, Messmer R. (2008) Charakterisierung Schweizer Maislandsorten. Vorträge für Pflanzenzüchtung 77, Biodiversität in der Pflanzenproduktion, Gesellschaft für Pflanzenbauwissenschaften e.V., Göttingen
- Foiada F. (2008) Analysis of the cold tolerance in the core collection of Swiss maize landrace accessions. Masterarbeit D-AGRL, ETH Zürich, Zürich

5. Ausblick

Um die morphologischen Merkmale und deren Unterscheidbarkeit aus den Jahren 2004 - 2008 bestätigen, bzw. ausbauen zu können, wird im Jahr 2009 ein Feldversuch zur phänotypischen Charakterisierung der Kernkollektion in Lindau/Eschikon (ZH) durchgeführt.

Der Vergleich zwischen genetischen und phänotypischen Distanzen wird die Genauigkeit bei der Charakterisierung Schweizer Maislandsorten erhöhen und Aussagen über den Nutzen morphologischer Deskriptoren zu derselben ermöglichen.

Der Vergleich zwischen genetischen Daten der Kernkollektion und Daten einer internationalen Studie (Dubreuil et al. 2006) wird demnächst durchgeführt. Der Kontakt mit der entsprechenden Forschungsgruppe in Frankreich besteht.

Da Phasen mit niedriger Temperatur nicht vorhersehbar sind wird im Jahr 2009 auf Feldversuche zur Frühsaatverträglichkeit und Jugendentwicklung verzichtet. Als Ersatz dafür wird die ganze Kernkollektion auf ihre Kühltoleranz unter kontrollierten Bedingungen bis etwa zum Dreiblattstadium in Klimakammern untersucht. Neuerdings wird erfasst, wie gut sich die Pflanzen von temporärem Kühlestress erholen. Dafür wird die Chlorophyllfluoreszenz wiederholt gemessen und es werden gestaffelte Ernten durchgeführt. Basierend auf diesen Resultaten und den Erkenntnissen aus den letztjährigen Klimakammerversuchen werden so einige besonders kühltolerante Akzessionen mit besonders robustem Photosyntheseapparat und guter Sprossbiomassebildung ausgewählt („Top-Kandidaten“). Diese werden einer angepassten und aufwändigen Testprozedur unterworfen, bei der sie mit mehreren modernen, kühltoleranten Maishybriden verglichen werden. Besonderes Augenmerk wird dabei der Biomasseentwicklung in der Erholungsphase (nach dem Kühlestress) beigemessen. Es wäre aus arbeitstechnischen Gründen nicht möglich, die gesamte Kernkollektion auf diese Weise zu untersuchen.

6. Allgemeine Informationen und allfällige Probleme

Die Daten der letztjährigen Versuche konnten noch nicht abschliessend analysiert werden und wurden deshalb noch nicht in die Nationale Datenbank aufgenommen.

Literaturangaben

Dubreuil P, Warburton M, Chastanet M, Hoisington D, Charcosset A (2006) More on the introduction of temperate maize into Europe: Large-scale bulk SSR genotyping and new historical elements. *Maydica* 51:281-291

Duvick DN (2005) The contribution of breeding to yield advances in maize (*Zea mays* L.). *Adv Agron* 86:83-145

Eschholz TW, Peter R, Stamp P, Hund A (2008) Genetic diversity of Swiss maize (*Zea mays* L. ssp. *mays*) assessed with individuals and bulks on agarose gels. *Genet Resour Crop Evol* 55:971-983

Fracheboud Y, Haldimann P, Leipner J, Stamp P (1999) Chlorophyll fluorescence as a selection tool for cold tolerance of photosynthesis in maize (*Zea mays* L.). *J Exp Bot* 50: 1533-1540.

Freitag N, Stamp P, Messmer R. (2008) Charakterisierung Schweizer Maislandsorten. Vorträge für Pflanzenzüchtung 77, Biodiversität in der Pflanzenproduktion, Gesellschaft für Pflanzenbauwissenschaften e.V., Göttingen

Peter R, Eschholz TW, Stamp P, Liedgens L (2009) Swiss Flint maize landraces – A rich pool of variability for early vigour in cool environments. *Field Crops Res* 110: 157-166

Rebourg C, Gouesnard B, Charcosset A (2001) Large scale molecular analysis of traditional European maize populations. Relationships with morphological variation. *Heredity* 86:574-87

Reif JC, Melchinger AE, Frisch M (2005a) Genetical and mathematical properties of similarity dissimilarity coefficients applied in plant breeding and seed bank management. *Crop Science* 45:1-7

Reif JC, Hamrit S, Heckenberger M, Schipprack W, Maurer HP, Bohn M, Melchinger AE (2005b) Genetic structure and diversity of European flint maize populations determined with SSR analyses of individuals and bulks. TAG 111: 906-913.

Warburton ML, Xianchun X, Crossa J, Franco J, Melchinger AE, Frisch M, Bohn M, Hoisington D (2002) Genetic Characterization of CIMMYT Inbred Maize Lines and Open Pollinated Populations Using Large Scale Fingerprinting Methods. Crop Science 42:1832-1840

Weir and Cockerham (1984) Estimating F-statistics for the analysis of population structure. Evolution 38: 1358-1370

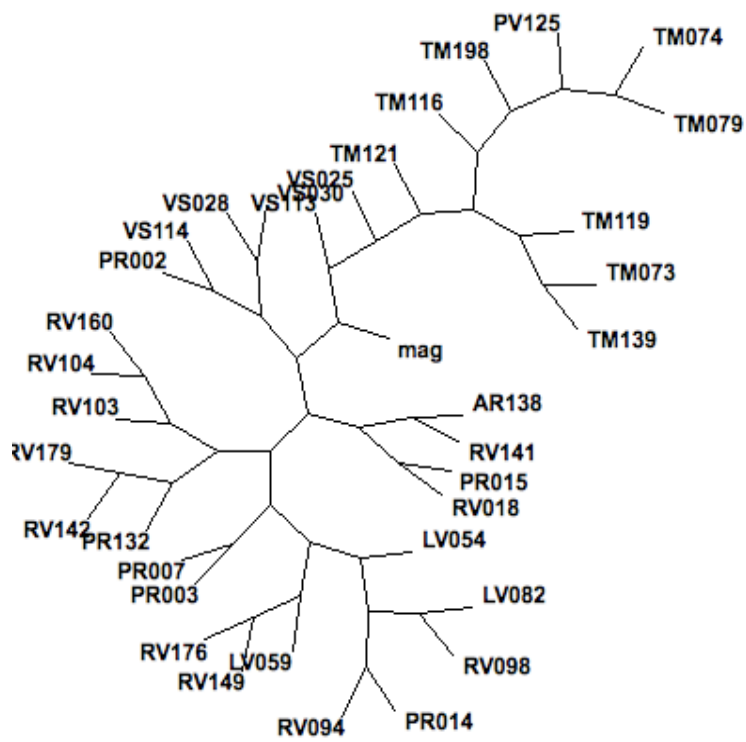
Anhang

Tabelle 1: Liste der verwendeten SSRs

phi008	phi029	phi031	phi034	phi041
phi046	phi056	phi062	phi063	phi065
phi075	phi076	phi079	phi083	phi085
phi102228	phi109188	phi109275	phi112	phi114
phi123	phi127	phi227562	phi308707	phi331888
phi96100	umc1161	umc1266	umc1304	umc1367
umc1447	umc1545	umc1917	umc2047	umc2250

Tabelle 2: Übersicht über die morphologischen bzw. morpho-physiologischen Merkmale und über die Jahre in denen sie erfasst wurden. Mit (*) markierte Merkmale werden u.a. zur Sortenunterscheidung in Mais verwendet. BBCH: Wachstumsstadium, Nr: Merkmalsnummerierung nach UPOV (Union for the Protection of New Varieties of Plants).

Merkmale	Nr.	BBCH	2003	2005	2007	2008
Tage bis zur männl. Blüte	7*	65	x	x	x	x
Anthesis-Silking Interval	15*	65	x	x		x
Kolbendurchmesser	27	92	x	x	x	x
Kolbenlänge	26*	92	x	x	x	x
Emergence in %			x	x	x	x
Kolbenhöhe			x	x	x	x
Early Vigour			x	x	x	x
relative Kolbenhöhe	23	75	x	x	x	x
Kornreihen	29	92	x	x	x	x
TKG			x	x	x	
Pflanzenhöhe	22.2*	75	x	x	x	x
Anzahl primärer Fahnenäste	14*	65		x		x
Anthocyanfärbung der Narbenfäden	16*	65		x		x
Intensität von SILA	17*	65				x
Seneszenzbonitur / SPAD- Werte					x	x
Länge des Lieschblattes						x
Bestockungsindex (Best./Pflz.)						x
Form Primärblatt	2	14				x
Winkel zwischen Mittel- und Seitenästen	12*	65				x
Farbe des Stängels		65-75				x
Anthocyanfärbung der Hüllspelze Rispe	8	65		x		x
Länge Mittelachse ab unterem Fahnenast	19	71		x		x
Länge Mittelachse ab oberem Fahnenast	20*	71		x		x
Stängelstabilität			x			x



Grafik 1: Abstammungsbaum (Dendrogramm) der genetischen Distanzen in der Kernkollektion nach wiederholtem Bootstrapping.
