



Doctoral Thesis

Molecular and physiological analysis of chilling tolerance in maize (*Zea mays* L.) seedlings

Author(s):

Biradar, Sunil Kumar

Publication Date:

2008

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-005786359> →

Rights / License:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

Diss. ETH No. 18028

**Molecular and physiological analysis of chilling tolerance
in maize (*Zea mays* L.) seedlings**

A dissertation submitted to the
ETH ZURICH
for the degree of
DOCTOR OF SCIENCES

presented by

SUNIL KUMAR BIRADAR

M.Sc. in Agricultural Sciences, University of Agricultural Science, Dharwad, India

born 1. June 1976

Citizen of India

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. P. Stamp, examiner

Dr. C. Sautter, co-examiner

Dr. J. Leipner, co-examiner

Zurich, 2008

Summary

Maize (*Zea mays* L.) is a crop of tropical/subtropical origin. It requires a temperature of about 25-35 °C for growth and development. In temperate regions, however, maize is sown during spring, where maize seedlings are often exposed to suboptimal temperature coupled with short spells of chilling events. In particular, the growth and early development of the seedling may be strongly affected by low temperature. A better understanding of the genetic and physiological basis of the effect of low temperature on maize may help to alleviate the problems associated with the chilling sensitivity of maize seedlings. The genetic basis of chilling tolerance has been studied by analysis of the quantitative trait locus (QTL); several QTLs for chilling tolerance of photosynthesis were identified in a Swiss dent maize mapping population derived from the cross of the chilling sensitive line ETH-DL3 and the chilling tolerant line ETH-DH7. In order to conduct an in-depth study of the major QTL for chilling tolerance of photosynthesis, which was found in the above mentioned study in the telomeric region of the long arm of chromosome 6, physiological and genetic analyses were conducted in backcross populations and near isogenic lines (NILs) derived from the ETH-DL3 × ETH-DH7 population as well as in an alternative F₂ population. Based on the results, the aim was to identify further potential candidate genes which may underlay this QTL for chilling tolerance of photosynthesis.

In order to narrow down the confidence interval of the major QTL for chilling tolerance of photosynthesis on chromosome 6, in a first step, 17 simple sequence repeat (SSR), 18 indel polymorphism (IDP) and 21 newly designed SSR markers from BAC sequences, located in the QTL region, were analyzed for parental polymorphism. Two polymorphic SSR markers were identified. The re-analysis of the data of the previous QTL study with the two additional polymorphic SSR markers revealed an additional QTL in the telomeric region of the long arm of chromosome 6, which was also associated with chilling tolerance of photosynthesis. The re-analysis showed that the first QTL (QTL-1) is flanked by the markers *umc1859* and *bnlg1740*, while the other, new, QTL (QTL-2) is flanked by markers *bnlg1136* and *umc1653*.

In order to elucidate the physiological and genetic basis of the above mentioned two QTLs, a marker assisted backcross breeding was carried out. The chromosomal region, which harbors the QTLs for chilling tolerance of photosynthesis, was introgressed by marker assisted fore- and back-ground selection from the chilling tolerant line ETH-DH7 into the chilling sensitive

ETH-DL3 background. The QTL analysis by single factor ANOVA demonstrated the stable expression of the introgressed segment over backcrossed generations. The QTL analysis by composite interval mapping in the BC₃F₂ population confirmed again the presence of two separate QTLs in the introgressed segment of chromosome 6. QTL-1 was found right at the SSR marker *bnlg1740* and was associated with the maximal quantum efficiency of PS II primary photochemistry (F_v/F_m), the minimal fluorescence (F_o), the operating quantum efficiency of PS II (Φ_{PSII}), the quantum efficiency of open PS II reaction centers (F_v'/F_m'), the carbon exchange rate (CER) and leaf greenness. QTL-2, which is flanked by the markers *bnlg1136* and *umc1653*, was associated with F_o and F_v/F_m . Furthermore, a time course analysis of the QTLs indicated a differential expression of both QTLs in different leaves and in different temperature regimes. Significant QTL effects but only in leaves that developed at suboptimal temperature indicate that both QTLs are involved in the development of a functional photosynthetic apparatus at suboptimal temperature.

Near isogenic lines (NILs) to ETH-DL3, which carried the ETH-DH7 allele in the QTL region, were developed from selected BC₃F₂ lines. Two NILs in the BC₃F₄ generation were obtained and contained the target region including QTL-1 and QTL-2. The light response curves of the parental lines and the NILs showed that the efficiency and capacity of photosynthesis were affected by growth at suboptimal temperature; however, a more substantial reduction was observed in ETH-DL3 compared to chilling tolerant parent ETH-DH7 as well as the NILs. The higher photosynthetic efficiency of the NILs compared to ETH-DL3 was due to high a Φ_{PSII} , which in turn due to both a higher photochemical quenching factor (q_P) and, in particular, a higher F_v'/F_m' . This indicates that the NILs maintain a higher fraction of open PS II reaction centers, which were characterized by higher quantum efficiency. Furthermore, the parameter Φ_{NO} , which is a measure of chilling-induced structural alterations of the photosynthetic apparatus, was lower in the NILs compared to the chilling sensitive line ETH-DL3. This finding proved further that the QTL on chromosome 6 plays a role in the assembly of a functional photosynthetic machinery.

The importance of the telomeric region of chromosome 6 for chilling tolerance was studied in an alternate F₂ population, which was derived from the cross of the chilling sensitive dent maize line ETH-DL7 and the chilling tolerant flint maize line ETH-FH6. Bulk segregant analysis (BSA) was employed to quickly analyze the importance of chromosome 6 for chilling tolerance of photosynthesis in this population. The QTL analysis revealed one QTL in this region, between the SSR markers *bnlg1740* and *umc1897*. Based on its position and its behavior, this QTL seemed to correspond to QTL-1 of the ETH-DL3 × ETH-DH7 mapping

population. The conservation of this QTL in different mapping populations indicated the importance of this genomic region for the development of a functional photosynthetic apparatus at suboptimal temperature.

Potential candidate genes were identified by *in silico* analysis of the QTL region, which contains 232 expressed sequence tags (ESTs). A further search for homology against EST sequences from publicly available maize cold stressed library, revealed 33 putative candidate genes, which are induced under chilling stress conditions. Among these, three genes were directly involved in photosynthesis. In particular, *cab-m7*, coding for a light harvesting complex II protein and the gene of the protease DegP1, which is known to be involved in the repair of PS II, explained the observed phenotype of the studied QTL. However, further fine mapping and functional genomic experimentation will be required to clarify whether one of these genes underlies of the QTL for chilling tolerance of photosynthesis on the long arm of chromosome 6.

Zusammenfassung

Mais (*Zea mays* L.) ist eine Kulturpflanze (sub)tropischen Ursprungs. Sie benötigt eine Temperatur von ungefähr 25 bis 35 °C für ein optimales Wachstum und Entwicklung. Mais wird jedoch in den gemässigten Zonen im Frühling gesät, wenn die Pflanzen suboptimalen Temperaturen und kurzen Kälteeinbrüchen ausgesetzt sein können. Insbesondere das Wachstum und die frühe Entwicklung der Sämlinge kann durch niedrige Temperaturen stark gestört werden. Ein besseres Verständnis der genetischen und physiologischen Ursachen der Effekte niedriger Temperatur auf Mais ist nötig, um züchterisch eine verbesserte Kühltoleranz der Maissämlinge zu erreichen. In einer vorherigen Studie wurde die genetische Ursache der Kühltoleranz in einer *Quantitative Trait Locus* (QTL) Analyse untersucht. Dabei wurden in einer Schweizer Zahnmaispopulation, welche aus der Kreuzung der kühesensitiven Inzuchtlinie ETH-DL3 und der kühltoleranten Linie ETH-DH7 hervorging, mehrere QTLs für die Kühltoleranz der Photosynthese identifiziert. Um diesen QTL für die Kühltoleranz der Photosynthese, welcher in der oben genannten Population in der telomerischen Region des langen Arms von Chromosom 6 gefunden wurde, besser zu untersuchen, wurden physiologische und genetische Analysen in Rückkreuzungspopulationen und nahe-isogene Linien (NILs) der ETH-DL3 × ETH-DH7 Population sowie in einer alternativen F₂-Population durchgeführt. Basierend auf den erhaltenen Ergebnissen sollten potentielle Kandidatengene identifiziert werden, die möglicherweise diesem QTL für die Kühltoleranz der Photosynthese unterliegen.

Mit dem Ziel das QTL-Konfidenzintervall einzugrenzen, wurden in einem ersten Schritt 17 Mikrosatelliten (SSR Marker), 18 *indel* Polymorphismus (IDP) Marker sowie 21 aus BAC Sequenzen konstruierte SSR Marker, welche in der QTL-Region lokalisiert sind, auf elterliche Polymorphismen untersucht. Dabei wurden zwei polymorphe SSR Marker identifiziert. Die Reanalyse der Daten aus der vorherigen QTL-Studie mit den beiden neuen polymorphen SSR Markern zeigte ein zusätzliches QTL in der telomerischen Region des langen Arms von Chromosom 6 auf, welches mit der Kühltoleranz der Photosynthese assoziiert war. Die Reanalyse ergab, dass das erste QTL (QTL-1) durch die Marker *umc1859* und *bnlg1740* flankiert ist, während das zweite QTL (QTL-2) zwischen den Markern *bnlg1136* und *umc1653* liegt.

Markergestützte Rückkreuzungen wurden durchgeführt, um die physiologischen und genetischen Ursachen der beiden oben genannten QTLs in grösserer Genauigkeit zu untersuchen.

Die chromosomale Region, welche den QTL für die Kühletoleranz der Photosynthese beinhaltet, wurde durch markergestützte Selektion von der kühletoleranten Linie ETH-DH7 in die kühesensitive Linie ETH-DL3 eingefügt. Die QTL-Analyse mittels ANOVA zeigte eine stabile Expression des eingefügten chromosomalen Segments in den verschiedenen Rückkreuzungsgenerationen. Die QTL-Analyse mittels *Composite Interval Mapping* in der BC₃F₂-Generation bestätigte das Vorhandensein von zwei unabhängigen QTLs im eingefügten Segment von Chromosom 6. Das QTL-1 wurde nahe des SSR Markers *bnlg1740* lokalisiert und war mit der maximalen Quanteneffizienz der primären Photochemie des Photosystem II (F_v/F_m), der minimalen Fluoreszenz (F_0), der aktuellen Quanteneffizienz von Photosystem II (Φ_{PSII}), der Quanteneffizienz der offenen Photosystem II Reaktionszentren (F_v'/F_m'), dem CO₂-Austausch und der Blattgrüne assoziiert. QTL-2, welches durch die Marker *bnlg1136* und *umc1653* flankiert war, war mit F_0 und F_v/F_m assoziiert. Das Vorhandensein von signifikanten QTL-Effekten nur in Blättern, die sich unter suboptimaler Temperatur entwickelten, deutet an, dass beide QTLs in der Entwicklung eines funktionsfähigen photosynthetischen Apparates involviert sind.

Von ausgewählten BC₃F₂ Linien wurden NILs zu ETH-DL3 entwickelt, welche das ETH-DH7-Allel in der QTL-Region besaßen. Es wurden zwei NILs in der BC₃F₄-Generation erhalten, die die Zielregion mit QTL-1 und QTL-2 enthielten. Die Lichtsättigungskurven der elterlichen Linien und der NILs zeigten, dass sowohl die photosynthetische Effizienz als auch deren Aktivität durch suboptimale Wachstumstemperatur beeinträchtigt war. Jedoch wurde eine deutlichere Reduktion in ETH-DL3 im Vergleich zu ETH-DH7 und den NILs beobachtet. Die höhere photosynthetische Effizienz der NILs im Vergleich zu ETH-DL3 beruhte auf eine höhere Φ_{PSII} , die wiederum durch einen höheren Faktor der photochemischen Löschung (q_P) und insbesondere einer höheren F_v'/F_m' verursacht wurde. Diese Beobachtung deutete daraufhin, dass die NILs einen grösseren Anteil an offenen PS II Reaktionszentren aufweisen, die zu dem durch eine höhere Quanteneffizienz charakterisiert waren. Ausserdem war der Parameter Φ_{NO} , welcher ein Mass für kühleinduzierte Veränderungen in der Struktur des photosynthetischen Apparates ist, in den NILs niedriger im Vergleich zur kühesensitiven Linie ETH-DL3. Diese Erkenntnis gab einen weiteren Beleg für die Rolle des QTLs auf Chromosom 6 für den Aufbau einer funktionstüchtigen photosynthetischen Maschinerie.

Die Wichtigkeit der telomerischen Region von Chromosom 6 für die Kühletoleranz der Photosynthese wurde auch in einer alternativen F₂-Population, welche aus der Kreuzung zwischen der kühesensitiven Zahnmaislinie ETH-DL7 und der kühletoleranten Flintmaislinie ETH-FH6 abgeleitet wurde, untersucht. Um möglichst schnell die Wichtigkeit von Chromo-

som 6 für die Kühletoleranz der Photosynthese in dieser Population zu untersuchen, wurde zunächst eine *Bulk Segregant Analysis* (BSA) durchgeführt. Die QTL-Analyse bestätigte einen QTL in dieser chromosomalen Region, welcher zwischen den SSR Markern *bnlg1740* und *umc1897* lag. Basierend auf seine Position und Charakteristika, kann vermutet werden, dass dieser QTL mit dem QTL-1 der ETH-DL3 × ETH-DH7 Population korrespondiert. Das Vorhandensein dieses QTLs in verschiedenen Kartierungspopulationen unterstreicht die Wichtigkeit dieser genomischen Region für die Entwicklung eines funktionsfähigen photosynthetischen Apparates unter suboptimaler Temperatur.

Potentielle Kandidatengene wurden in der QTL-Region, welche 232 *Expressed Sequence Tags* (ESTs) enthält, *in silico* identifiziert. Eine Homologiesuche für EST-Sequenzen in einer öffentlichen cDNA-Bibliothek von kühegestressten Mais ergab 33 putative Kandidatengene. Unter diesen befanden sich drei Gene, welche direkt in der Photosynthese involviert sind. Insbesondere *cab-m7*, welches für ein Lichtsammler-Chlorophyll *a/b*-Protein II kodiert, und das Gen der DegP1 Protease, welche in der Wiederherstellung des Photosystems II involviert ist, könnten gut den Phänotypen des untersuchten QTLs erklären. Dennoch muss berücksichtigt werden, dass eine bessere Kartierung und funktionelle genetische Beschreibung nötig sind, um abzuklären, ob diese Gene dem QTL für Kühletoleranz der Photosynthese auf dem langen Arm von Chromosom 6 zugrunde liegen.