

Justus-Liebig-Universität Gießen

Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung I

Professur für Pflanzenzüchtung

**Untersuchungen zur genetischen Architektur
der Kältetoleranz bei Sorghum
(*Sorghum bicolor* L. Moench)**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. agr.)
im Fachbereich Agrarwissenschaften, Ökotoxikologie und
Umweltmanagement der Justus-Liebig-Universität Gießen

Prüfer

1. Prof. Dr. Rod Snowdon
2. Prof. Dr. Matthias Frisch

vorgelegt von

André Marcel Schaffasz, M. Sc. aus
Offenbach am Main, Deutschland

Gießen, Mai 2020

„Der praktische Mann weiß nicht, daß man sich sehr lange mit kleinen, scheinbar unbedeutenden Dingen abmühen muß, ehe man das Große begreift.“

Justus Liebig, 1859

Inhaltsverzeichnis

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	IV
Abkürzungsverzeichnis	V
 1 Allgemeine Einleitung	 1
1.1 Sorghum Produktion im globalen Kontext	1
1.2 Die Domestikation, Diversität und Biologie von Sorghum	2
1.3 Nutzungsformen von <i>Sorghum bicolor</i>	6
1.4 Abiotische und biotische Stresstoleranzen	8
1.5 Züchtung von Sorghum	10
1.6 Bedeutung des Anbaus von Sorghum in Europa	14
2 Ziele der Arbeit	17
3 Publikation I: Reproductive Cold Stress Tolerance in Sorghum F1 Hybrids is a Heterotic Trait	18
4 Publikation II: Sorghum as a Novel Crop for Central Europe: Using a Broad Diversity Set to Dissect Temperate-Adaptation	40
5 Allgemeine Diskussion	64
5.1 Die Anpassung von Sorghum an mitteleuropäische Bedingungen schreitet voran – dem Mais dicht auf den Fersen?	65
5.2 Mechanismen hinter der Kältetoleranz	67
5.3 Identifizierung und Prüfung von stresstoleranten Genotypen	70
5.4 Sorghum Hybridzüchtung für Mitteleuropa	73
5.5 Fazit	77
6 Zusammenfassung	78
7 Summary	80
8 Quellenverzeichnis	82
9 Eidesstattliche Erklärung	97
10 Danksagung	98
Anhang	99

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1. Globale Verbreitungs-Geschichte von <i>S. bicolor</i> zeigt das primäre Entstehungs-Zentrum in der Region von Äthiopien und Sudan, sowie die sekundären Entwicklungs-Zentren in Indien und China (modifiziert nach Klein et al. 2015).	3
Abbildung 2. Zeigt die fünf verschiedenen Sorghum-Rassen, <i>guinea</i> (links), <i>bicolor</i> (Mitte, oben), <i>kafir</i> (Mitte, unten) <i>durra</i> (rechts, oben) und <i>caudatum</i> (rechts, unten) (eigene Aufnahmen).	3
Abbildung 3. Phylogramm-Darstellung der Verwandtschaft in einem Diversitätsset, bestehend aus n = 338 Individuen mit der „neighbor-joining method“. Die fünf Kluster zeigen die Gruppierung der Individuen nach dem geographischen Ursprung und der Rasse (Schaffasz et al. 2019b).	5
Abbildung 4. Anbauflächen von Kornsorghum (gelb) und Grünschnittsorghum (grün) in Europa (Angaben in Tsd. Hektar). Die blaue Linie zeigt den 50° Breitengrad (FaoStat, gelb: Mittelwerte 2013 – 2017, grün: Werte aus dem Jahr 2013, sowie Schätzung der deutschen Sorghum Fläche des DMK e.V.).	16
Abbildung 5. Verteilung des Merkmals Panicle Harvest Index in einem im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Diversitäts-Set (n = 328). Links wird die Verteilung für den Stress-Standort Texcoco (2017) im mexikanischen Hochland und rechts die Verteilung am Sorghum-Gunststandort Groß-Gerau (2018) gezeigt.	67
Abbildung 6. Darstellung des für <i>Sorghum bicolor</i> kritischen Stadiums bei reproduktivem Kältestress unter kontrollierten Bedingungen (25° C Tag / 7° C Nacht) an einem empfindlichen Genotyp. Das obere Bild zeigt das kritische Stadium BBCH 37, in dem bei Stress kein lebensfähiger Pollen gebildet werden kann. Das untere Bild zeigt das BBCH Stadium 43. Sorghum ist in dieser Entwicklungsphase nicht mehr anfällig gegenüber Kältestress, was die hohe Lebensfähigkeit des Pollens von über 80 % zeigt. Die Lebensfähigkeit des Pollens wurde mittels eines <i>Impedance Flow Cytormeter</i> von Amphasys gemessen (für eine genauere Beschreibung des <i>IFC</i> siehe Kapitel 3 und 4.3).	70
Abbildung 7. Kältetolerante Akzession (eingekörnte Rispe) und kälteempfindliche Akzession (wenig Körner an der Rispe) aus dem hier untersuchten Diversitäts-Set (n = 328) in Rauschholzhausen 2016.	72
Tabelle 1. Globale Sorghum Produktion und die wichtigsten Produzenten von Kornsorghum in Europa (Quelle: FaoStat).	14

Abkürzungen:

CMS Cytoplasmatische Männliche Sterilität
GCA Generelle Kombinations Eignung
GS Genomische Selektion
IFC Impedance Flow Cytometer
Jh. Jahrhundert
LP Linien per se Leistung
mb Megabasenpaare
MPH mid-parent heterosis (= F₁ - Elternmittel)
PHI Panicle Harvest Index
QTL Quantitative Trait Locus/Loci
SCA Spezielle Kombinations Eignung
SNP Single Nucleotide Polymorphism

1 Allgemeine Einleitung

1.1 Sorghum Produktion im globalen Kontext

Sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) ist ausgehend von der Produktionsfläche die fünft wichtigste Getreideart weltweit. Im Jahr 2017 wurden 57,6 Mio. t Sorghum von rund 40,6 Mio. Hektar Anbaufläche geerntet (FaoStat: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>). Sorghum wird in vielen Teilen der Welt angebaut, jedoch vorrangig in marginalen Regionen, mit hohen Temperaturen, wenig Niederschlag und schlechten Böden. In diesen Regionen ist der Anbau von Sorghum lukrativer als der Anbau von Reis (*Oryza sativa*) oder Mais (*Zea mays*) (Mundia et al. 2019). Auf dem afrikanischen Kontinent wird dabei auf 42,1 % der landwirtschaftlich genutzten Flächen Sorghum produziert, gefolgt von den amerikanischen Staaten (Nord- und Südamerika) mit 37,5 %, Asien mit 15,4 %, Ozeanien mit 3,4 % und Europa mit 1,6 % (Produktionsanteil nach Regionen von 2008-2017) (FaoStat: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>). Hierbei zeigt sich ein großer Kontrast bezüglich der Nutzung von Sorghum zwischen den Produktionsländern. In Nigeria, Indien, Sudan oder Äthiopien dient Sorghum als Grundnahrungsmittel und wird meist in kleinbäuerlichen Strukturen angebaut. Besonders in Afrika stellt Sorghum daher ein Grundnahrungsmittel für viele Millionen Menschen dar (Mejia & Lewis 1999). Der Flächenertrag in diesen kleinbäuerlichen Strukturen liegt meistens bei weniger als 1 t ha⁻¹. Im Gegensatz dazu wird in den industrialisierten Ländern, wie den USA, Argentinien, Mexico, China und Australien Sorghum für den Export, die Viehfütterung, Bioethanol oder andere Veredelungsprozesse eingesetzt (Mundia et al. 2019). Hierbei sind die USA mit 10 Mio. t (2008-2017) die weltweit größten Produzenten. Dabei werden in diesen Ländern zum Großteil moderne Hybrid-Sorten angebaut, die stabilere und höhere Erträge im Vergleich zu Offen-abblühenden Landsorten aufweisen (Blum et al. 1992). Die Tatsache, dass Sorghum auch in industrialisierten Ländern auf Grenzstandorten angebaut wird, erklärt den relativ niedrigen Ertragsdurchschnitt von ~4 t ha⁻¹. Rekorderträge von ca. 20 t ha⁻¹ bei Kornsorghum sind unter optimalen Bedingungen möglich (Srinivasa et al. 2014). Neben Kornsorghum sind Futter- und Silagetypen besonders in den amerikanischen Ländern Argentinien, Mexiko und USA von großem Interesse.

Im Vergleich zu Mais, Reis und Weizen, die häufig durch Subventionen gestützt werden, wurde für Sorghum die Preisstützungspolitik durch die Deregulierung des Marktes oftmals stark reduziert. Durch politische Maßnahmen in den USA, Europa und Asien wurde zwischen den 1980er bis Mitte der 2000er die Sorghum-Produktion negativ beeinflusst (Bhagavatula et al. 2013). Mundia et al. (2019) folgerte, dass die Sorghum-Produktion insbesondere in den kleinbäuerlichen Strukturen zukünftig besser gefördert werden müsste, um auch in diesen Regionen Schwankungen, die durch den Klimawandel verursacht werden, besser zu begegnen. Im Gegensatz hierzu sind in den Industrieländern andere Faktoren zu beachten: Ernährungsgewohnheiten, die sich im Laufe der Zeit ändern oder auch andere

Produktionsverfahren (Bioethanol, Biogas, etc), die eine andere Kulturart präferieren, können zu einem Produktionsanstieg oder Produktionsabfall führen.

1.2 Die Domestikation, Diversität und Biologie von Sorghum

Sorghum bicolor gehört zur Familie der Poaceae, im Stamm der Andropogoneae, Sub-Stamm der Sorghinae und der Gattung *Sorghum* Moench (Clayton & Renvoize 1986). Insgesamt gehören 25 Arten zur Gattung *Sorghum*, die in fünf verschiedene Untergattungen eingegliedert werden: *Eu-Sorghum*, *Chaetosorghum*, *Heterosorghum*, *Parasorghum* und *Stiposorghum*. Alle domestizierten *Sorghum*-Arten, als auch viele wilde und grasartige Arten, wie *Sorghum halapense* gehören zur Untergattung *Eu-Sorghum*. Phylogenetische Studien zeigten, dass *S. bicolor* eng verwandt mit Zuckerrohr (*Saccharum officinarum* L.) und Mais (*Zea mays* L.) ist. Evolutionär haben sich Zuckerrohr und Sorghum vor ca. fünf Mio. Jahren und Mais und Sorghum vor ca. 15 - 20 Mio. Jahren getrennt (Dillon et al. 2007).

Smith & Frederiksen (2000) vermuteten, dass schon ca. 8000 v. Chr. Jäger und Sammler Sorghum als Nahrungsquelle nutzten. Auch Funde von Sorghum in der Nubischen Ebene Nabta Playa in Süd Ägypten wurden auf ca. 8000 v. Chr. datiert (Dahlberg & Wasylikowa 1996). Die Domestikation von *S. bicolor* fand um 4000 - 3000 v. Chr. in Äthiopien und den benachbarten Ländern statt (Dillon et al. 2007). Durch disruptive Selektion entwickelten sich viele verschiedene Variationen, sowohl domestizierte, als auch wilde Formen (Doggett 1988). Nomaden und Händler brachten um 1500 - 1000 v. Chr. diese verbesserten Sorghum-Typen in andere afrikanische Regionen und nach Indien, um ca. 900 - 700 v. Chr. in den Mittleren Osten und wahrscheinlich 400 n. Chr. in den Fernen Osten (Dillon et al. 2007). Von China gelangte Sorghum über Händler nach Europa (siehe Abb. 1), hier wurden die ersten Aufzeichnungen im 13. Jahrhundert in Italien dokumentiert (Becker-Dillingen 1927). Im Jahr 1757 wurden Sorghum Besen-Typen in den Vereinigten Staaten von Amerika von Benjamin Franklin eingeführt (Berenji et al. 2011).

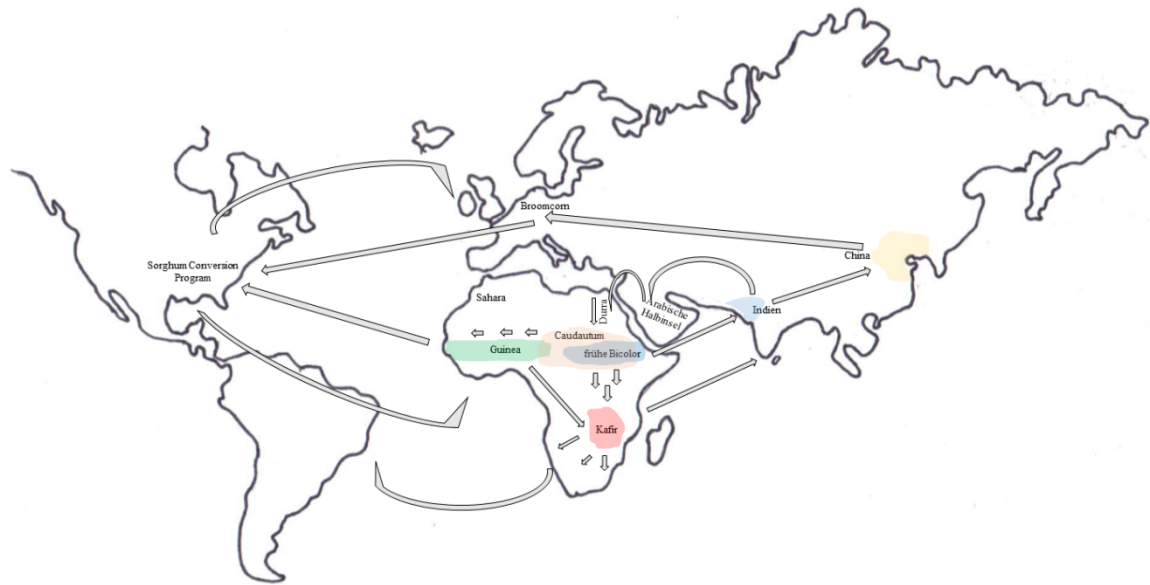


Abbildung 1. Globale Verbreitungs-Geschichte von *S. bicolor* zeigt das primäre Entstehungs-Zentrum in der Region von Äthiopien und Sudan, sowie die sekundären Entwicklungs-Zentren in Indien und China (modifiziert nach Klein et al. 2015).

Die jeweiligen Sorghum-Genotypen weisen die biologischen Merkmale ihrer Selektionsumwelt auf. Hinsichtlich der Nutzung bestehen bei *S. bicolor* große Unterschiede. So werden Typen für die Korn-, Zucker, Faser- und Silage-Nutzung unterschieden. Auch hinsichtlich des Habitus bestehen große Unterschiede, anhand von phänotypischen Merkmalen wie Rispenform, Spelzenarchitektur, Kornmerkmalen, Pflanzenhöhe und Anzahl von Seitentrieben wird die Art *S. bicolor* in fünf unterschiedliche Rassen und deren zehn Intermediate eingeteilt: *bicolor*, *guinea*, *caudatum*, *kafir* und *durra* (Dahlberg et al. 2018) (siehe Abb. 2).

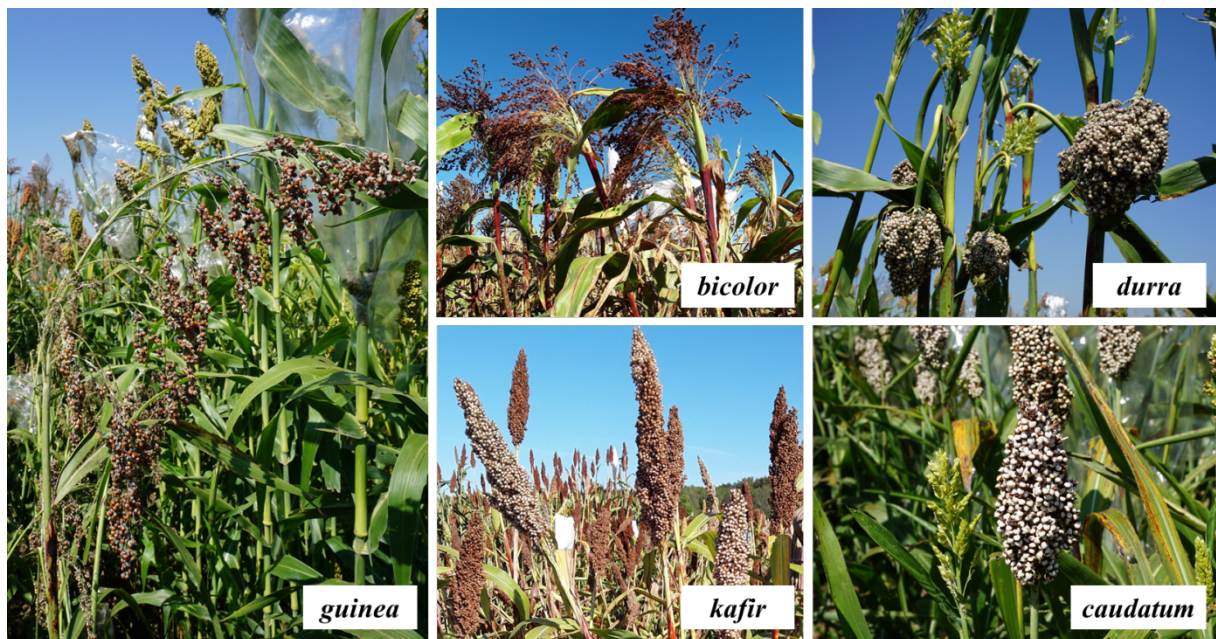


Abbildung 2. Zeigt die fünf verschiedenen Sorghum-Rassen, *guinea* (links), *bicolor* (Mitte, oben), *kafir* (Mitte, unten), *durra* (rechts, oben) und *caudatum* (rechts, unten) (eigene Aufnahmen).

Die älteste und primitivste Rasse ist *bicolor*, auffallend ist die offene, mittelgroße Rispe. Die Spelzen sind dick und ledrig, das Korn ist länglich und elliptisch geformt. Die Rasse *bicolor* ist überall auf dem Afrikanischen Kontinent anzutreffen, jedoch dominiert sie nicht (Kimber et al. 2013). Die Rispen der Rasse *guinea* sind länglich, oftmals noch offener aufgebaut als die Rispen der Rasse *bicolor*. Durch die langen Ästchen kommt es zu pendelnden Bewegung der Rispe. Die Spelzen sind offen, behaart und eingerollt (Mann et al. 1983). Das Hauptverbreitungsgebiet liegt in West Afrika, hierbei ist diese Rasse an die erhöhten Niederschlagsmengen angepasst. Im Nordosten des afrikanischen Kontinents ist die Rasse *caudatum* weit verbreitet (Stemler et al. 1975). Insbesondere durch die herausragenden agronomischen Eigenschaften und die hohe Qualität des Korns, ist die Rasse *caudatum* für moderne Sorghum-Zuchtprogramme eine wichtige Saatgutquelle (Dahlberg et al. 2018). Der Phänotyp der Rasse kennzeichnet sich durch eine längliche, mittel bis große, dicht bis minimal geöffnete Rispe. Die Körner haben eine flache und eine ovale Seite. Die Pflanzen der Rasse *caudatum* haben einen mittleren bis hohen Habitus und hohe Erträge (Mann et al. 1983). Die Rasse *kafir* hat im südlichen Afrika das größte Verbreitungsgebiet (Dahlberg et al. 2018). Die Rispe hat einen aufrechten, länglichen und semi-kompakten Aufbau. Die Körner sind flach, elliptisch und biconvex und manchmal komprimiert (Mann et al. 1983). Die Rasse *durra* ist charakterisiert durch eine kompakte, meistens ovale Rispe, sowie den oftmals zum „Schwanenhals“ gebogen Halm unterhalb der Rispe. Die Körner haben eine mittlere bis große, biconvexe und keilförmige Erscheinung (Dahlberg et al. 2018). Aufgrund der kompakten Rispe ist die Rasse *durra* bestens für trockene und heiße Standorte, wie die Sahel-Zone, die Arabischen Halbinsel und Indien angepasst (Kimber et al. 2013). Verwandtschaftsanalysen von Morris et al. (2013) zeigten, dass die einzelnen Herkünfte primär nach der geographischen Herkunft und sekundär nach der Rasse zugeordnet werden (siehe Abb. 3).

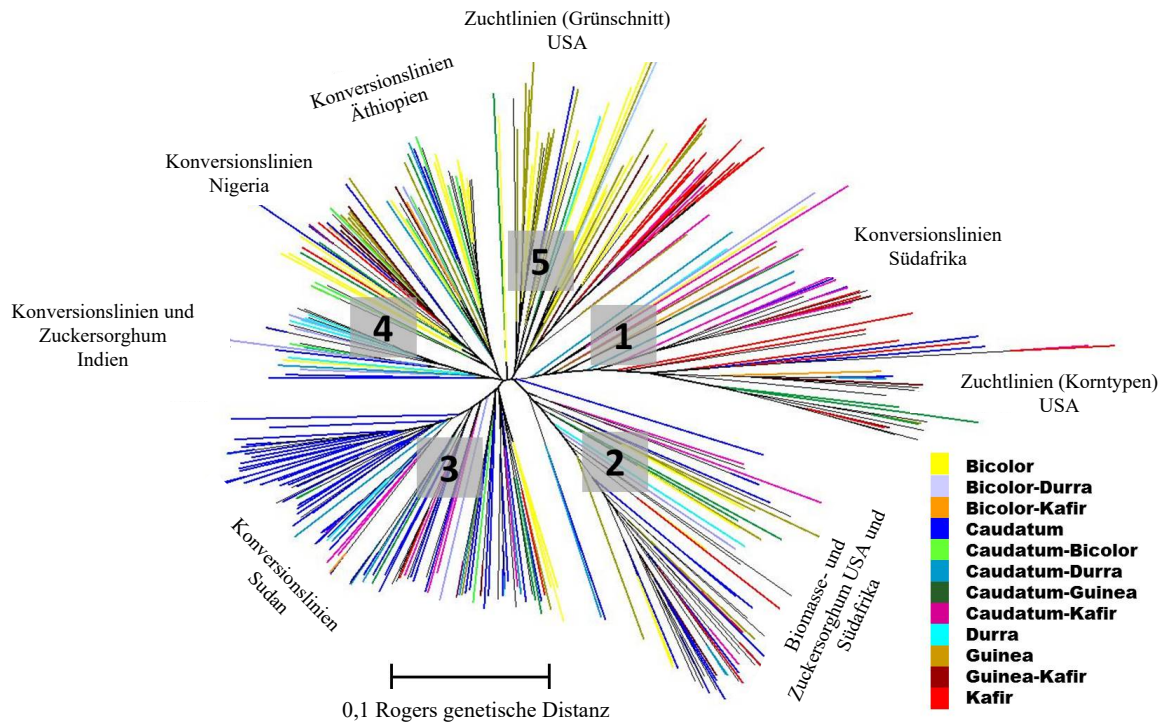


Abbildung 3. Phylogramm-Darstellung der Verwandtschaft in einem Diversitätsset, bestehend aus $n = 338$ Individuen mit der „neighbor-joining method“. Die fünf Kluster zeigen die Gruppierung der Individuen nach dem geographischen Ursprung und der Rasse (nach Schaffas et al. 2019b).

Eine Besonderheit von *S. bicolor* ist der C_4 -Metabolismus. Dadurch nutzt die Pflanze CO_2 bei höheren Temperaturen effizienter und verbraucht weniger Wasser und Stickstoff (Cooper & Kresovich 2018). *S. bicolor* ist ursprünglich eine photoperiodisch sensitive Kurztagpflanze. Die photoperiodische Reaktion wird bei Sorghum von vier Haupt-Loci Ma_1 , Ma_2 , Ma_3 , und Ma_4 kontrolliert, dominante Allele bewirken eine späte Blüte bzw. Reife (Quinby & Karper 1945, Quinby 1966). Weitere Reifegene, wie Ma_5 und Ma_6 (Rooney & Aydin 1999) sowie Ma_7 (Mullet et al. 2010) wurden beschrieben. Von den klassischen Reifegenen hat Ma_1 den größten Einfluss (Klein et al. 2008). Eine Mutation dieses Gens von dominant zu rezessiv trat unabhängig voneinander an mehreren Orten weltweit auf. Diese Mutation am Ma_1 Locus verleiht Sorghum die Anpassungsfähigkeit an gemäßigte Zonen (Brown & Paterson 2013, Klein et al. 2015). Diese Anpassung an gemäßigte Zonen ist jedoch eher an die Wärmesumme als an die spezifische Tageslänge gebunden (Brown & Paterson 2013). Das Merkmal Blühbeginn ist bei der gleichen Konfiguration an Reife-Allelen als weitgehend additiv beschrieben, bei Hybriden kann es zum Teil zu Dominanzeffekten in Richtung früherer Blüte kommen (Kirby & Atkins 1968). Neben den beschriebenen Hauptgenen wurden viele weitere QTL in Studien mit bi-parentalen Populationen (Mace et al. 2013a), „Nested-association-mapping“-Populationen (NAM) (Sukumaran et al. 2016, Bai et al. 2017) und einem Diversitäts-Set gefunden (Zhao et al. 2016). Von den beschriebenen Reifegenen sind bis heute nur die Funktionen von Ma_1 und Ma_3 bekannt, welche für ein „Pseudoresponse Regulator Protein 37 (PRR37)“ (Murphy et al. 2011) bzw. für „Phytochrom B“ kodiert (Childs et al. 1997).

Die Pflanzenhöhe bei Sorghum kann stark variieren. Das Spektrum reicht von extrem kurzen (0,5 m) Zwergtypen bis hin zu knapp 5 m hohen Biomasse-Typen. Wie bei den Reife-Genen wird die Pflanzenhöhe bei Sorghum über vier unabhängige „Dwarfing-Gene“ *Dw1*, *Dw2*, *Dw3*, *Dw4*, kontrolliert. Die niedrige Pflanzenhöhe wird dabei rezessiv vererbt (Quinby & Karper 1954). Hierbei kodiert *Dw3* für eine „MDR-class auxin efflux carrier“ (Multani et al 2003). Das „Sorghum Conversion Program“ konvertierte mehr als 673 exotische photoperioden-sensitive Akzessionen und nutzte dazu auf der mütterlichen Seite wenige, ausgewählte rekurrente Eltern, die photoperioden-Insensitivität und einen kurzen Habitus aufwiesen (Sleper & Poehlman 2006).

1.3 Nutzungsformen von *Sorghum bicolor*

Sorghum ist eine extrem diverse Kulturpflanze, die der Mensch vielseitig nutzen kann. Entsprechend ihrer Selektionsumwelt entwickelten sich unterschiedliche Nutzungsformen die sich in ihrem Habitus teils extrem voneinander unterscheiden und als „Ideotypen“ bezeichnet werden (Windpassinger 2016). Ideotypen stellen die optimale Anpassung einer Pflanze an ihre Zielumwelt oder ihre Nutzung dar. In vielen Entwicklungsländern in Afrika und Asien, in denen die mechanisierte Landwirtschaft noch keinen Einzug gehalten hat, werden Sorghum-Typen angebaut, die einen hohen Wuchs haben. Hierbei werden alle Teile der Pflanze genutzt. Der Halm dient als Bau- oder Feuermaterial, die Blätter werden an das Vieh verfüttert und die Körner werden zur menschlichen Ernährung genutzt. Ein Beispiel aus Mali zeigt, dass eine gewisse Pflanzenhöhe sogar erwünscht ist, damit das Vieh nicht an die korngefüllten Rispen kommt. Im Gegensatz zu der klein strukturierten Landwirtschaft in vielen Teilen von Afrika und Asien, werden für die mechanisierte Landwirtschaft verschiedene Nutzungsformen unterschieden, die auf ein End-Produkt abzielen: Korn-, Biomasse-/Faser-, Mehrschnitt-/Silage-, Zucker- und Besentypen.

Kornsorghum ist weltweit die wichtigste Nutzungsform. Moderne Korntypen sind durch eine große Rispe und eine Wuchshöhe von < 150 cm gekennzeichnet (Kimber et al. 2013). In den Herkunftsländern werden die Körner für die menschliche Ernährung verwendet. Hier werden unter anderem Fladenbrote (in Äthiopien „Injera“ genannt) aus dem Mehl gebacken, Breie und Porridge zubereitet oder das geschrotete oder gemahlene Sorghumkorn zu Getränken vergoren (Milchsäure-Vergärung) (Stoecker & Abegaz 2018). Des Weiteren wird das stärkehaltige Sorghumkorn auch für die Bioethanol-Gewinnung (Taylor et al. 2006) und zur Spirituosen-Produktion verwendet (Shapter et al. 2018). Auch zur Gewinnung von Farbstoffen wird das Korn verwendet. In den industrialisierten Anbauländern (USA, Mexiko, Australien, etc.) wird Kornsorghum zum größten Teil für die Viehfütterung bzw. Ethanolproduktion verwendet. Nur ein kleiner Teil wird in diesen Ländern für die menschliche Ernährung verarbeitet (Ruskin 1996, Mundia et al. 2019)

Die Zusammensetzung des Korns ist mit der von Weizen und Mais vergleichbar. Das Korn besteht zu ca. 60 - 75 % aus Stärke, 8 - 15 % Protein und 4 - 6 % aus Fetten (Bean et al. 2018). Wie auch bei anderen Getreidearten existieren bei Sorghum „Waxy-“ und „non-Waxy-Typen“. Bei „Waxy-Typen“ besteht die Stärke im Endosperm zu >95 % aus Amylopektin. Der Amylose-Gehalt wird von „Granule-bound-Starch“ Synthase kontrolliert. Es sind vier verschiedene allelische Zustände des Enzyms bekannt, die zu Ausprägung des Merkmals „Waxy“ führen (Pedersen et al. 2005, Sattler et al. 2009, Lu et al. 2013). Das Hauptspeicherprotein *Kafirin* wird der Prolamin-Fraktion zugeordnet (Taylor et al. 2006) und in die weiteren Fraktionen α -, β -, γ -, und δ -*Kafirin* untergliedert (Taylor & Taylor 2017). Wie bei allen Getreidearten stellt Lysin die erst-limitierende Aminosäure in Bezug auf die biologische Wertigkeit des Proteins dar (Bean et al. 2018). Da eine enge Verflechtung zwischen den Stärkekörnern und dem *Kafirin* besteht, ist der enzymatische Abbau durch die α -Amylase verzögert. Dies führt zu einer verminderten Energieaufnahme bei der Viehmast (Shapter et al. 2018), ist aber wiederum für die menschliche Ernährung gesundheitsfördernd (Stoecker & Abegaz 2018). Der Gehalt an Lipiden im Sorghumkorn ist wie bei allen Getreidearten gering. Sie kommen hauptsächlich im Keim vor (Taylor und Belton 2002). Das Farbspektrum von Sorghum geht von weiß, über gelb, zu rot, braun und in einigen Fällen sogar ins Schwarze. Hierbei werden die farbgebenden Substanzen ins Perikarp eingelagert. Auch der Durchmesser des Perikarps hat einen Einfluss auf die Farbe (Rooney & Miller 1982). Die Kornfarbe wird dabei über die *R* und *Y* Gene vererbt. Die Kombination *R_Y* entspricht einer roten Kornfarbe, *rrY* hingegen einer gelben Kornfarbe. Eine weiße Kornfarbe wird durch die Genkonfiguration *RRyy* und *rryy* vererbt. Des Weiteren können diese Grundfarben auch durch andere Gene beeinflusst werden. Hierzu zählt das „*Intensifier* Gen (*I*)“, welches insbesondere bei den Kornfarben rot und gelb zu einer Intensivierung der Kornfarben führt. Die Perikarp-Dicke wird über das *Z*-Gen kontrolliert, ein dünnes Perikarp (*ZZ* oder *Zz*) verleiht ein durchscheinendes Aussehen, wo hingegen ein dickes Perikarp (*zz*) ein kreidiges Aussehen verleiht (Rooney & Miller 1982). Die Pigmentierung kann auch zu einer unterschiedlichen Kornfarbe beitragen und wird über die Gene *B₁_B₂* vererbt (Earp et al. 1983). Karotinoide können die Kornfarbe bei Genotypen mit einer dünnen äußeren Schicht ebenfalls beeinflussen und geben dem Korn eine gelbe Farbe (Serna-Saldivar & Rooney 1995).

Viele Sorghum-Varianten enthalten polyphenolische Verbindungen wie phenolische Säuren, Flavonoide und Tannine im Perikarp (Taylor et al. 2014, Bean et al. 2018). Die bioaktiven Pflanzenstoffe sind oftmals Antworten der Sorghum-Pflanze auf abiotische und biotische Stressoren wie Klima, Krankheiten oder UV-Licht (Bean et al. 2018). Diese sekundären Pflanzenstoffe wirken in der Regel antikanzerogen, entzündungshemmend, antidiabetisch und positiv auf das Herz-Kreislaufsystem (Taylor et al. 2014). In der Viehfütterung hingegen wirken diese polyphenolischen Verbindungen einer raschen Gewichtszunahme entgegen (Mangan 1988). Die Vererbung von Tanninen bei *S. bicolor* wird von zwei dominanten Genen *B₁_B₂* gesteuert. Aus agronomischer Sicht haben tanninhaltige Sorghum Genotypen den Vorteil, dass diese toleranter gegenüber Schimmelpilzen sind (Knoll et al. 2008).

Eine Ganz-Pflanzen-Nutzung von KornSORghum ist ebenfalls möglich. Hierbei wird die Sorghumpflanze zur Milch- bzw. Teigreife mit einem Maishäcksler geerntet. Das Endprodukt kann zu Viehfütterung oder zu Erzeugung von Bioenergie verwendet werden. Besonders im Hinblick auf die Nutzung als Bioenergie-Pflanze zeichnet sich Sorghum durch seine Trockentoleranz und Anspruchslosigkeit gegenüber den allgemeinen Anbaubedingungen aus. Für den Anbau eignen sich, neben den besprochenen Korn-Typen, hohe Biomasse-Typen oder „*Dual-use* Typen“. Biomasse-Typen haben den Vorteil, dass sie eine große Masse mit sich bringen. Jedoch ist der Energiegehalt dieser Typen sehr gering und die Höhe dieser Ideotypen birgt Risiken wie Lager (Windpassinger et al. 2015). Beim „*Dual-use* Typ“ handelt es sich um einen intermediären Typen zwischen Korn- und Biomasse-Typ. Dieser Typ vereint Vorteile, wie eine höhere Energiedichte durch eine massigere Rispe mit einer geringeren Lageranfälligkeit durch eine Höhe von 2 - 2,5 m (Windpassinger et al. 2015).

Weiterhin wird in den USA und Australien die Gewinnung von Biotreibstoffen aus Cellulose angestrebt (Shapter et al. 2018), wobei in Europa Sorghum auch als Ersatz oder Ergänzung zum Mais, bevorzugt für die Erzeugung von Methan genutzt wird (Windpassinger et al. 2015).

Eine weitere Nutzungsform, insbesondere für die Tierernährung, sind vor allem Brown-midrib Typen (*Bmr*). Diese haben aufgrund von Mutationen in der Lignin-Biosynthese einen verringerten Gehalt an Lignin (Staggenborg & Shen 2018). Die mutierten Allele sind bekannt und wurden mittels chemischer Mutagenese erzeugt (Bittinger et al. 1981). Agronomisch wertvoll sind nur 3 der 4 mutierten Allele, *bmr2*, *bmr6* und *bmr12* (Fritz et al. 1990). Besonders bei den grasartigen Futter-Typen sind *Bmr*-Typen sinnvoll, da hier eine schnellere Energieaufnahme gegeben ist. Futter-Typen können gehäckselt und siliert werden, als Frischfutter verfüttert (Staggenborg & Shen 2018) oder beweidet werden.

Neben den Biomasse-, Futter- und *Dual-use* Typen existieren Zuckertypen, die durch einen saftigen Halm mit einer Zuckerkonzentration von über 15 % charakterisiert sind (Wu et al. 2010). Traditionell wird dieser Ideotyp zur Herstellung von Zuckersirup in den südlichen Staaten der USA verwendet (Walton et al. 1938). Neben der Zuckersirup-Herstellung eignen sich die Sorghum Zucker-Typen zudem zur Bioethanol-Herstellung (Staggenborg & Shen 2018). Einen Nischenmarkt besetzen die Besentypen (*Broomcorn*). Diese besondere Ausprägungsform der Rasse *bicolor* wird traditionell in der Balkanregion zu Besenherstellung verwendet (Berenji et al. 2011).

1.4 Abiotische und biotische Stresstoleranzen

Sorghum bicolor weist besonders gegenüber abiotischen Stressoren ein hohes Maß an Toleranzen auf. Insbesondere die hohe Trockentoleranz und Nährstoffeffizienz sind hierbei gegenüber anderen Kulturarten hervorzuheben (Tari et al. 2013). Die Wassernutzungseffizienz pro Einheit produzierter Trockenmasse ist bei Sorghum mit 372 Kg ^{cm⁻¹} im Vergleich zu Mais mit 272 Kg ^{cm⁻¹} und der Sojabohne mit 135 Kg ^{cm⁻¹} am höchsten (Djanaguiraman et al. 2018). Maßgeblich für die hohe Trockentoleranz von

Sorghum ist das weitläufige Wurzelsystem, das eine Wasseraufnahme aus tiefen Bodenschichten ermöglicht (House 1985). Eine Sensitivität gegenüber Trockenstress besteht sowohl zu Zeitpunkten vor (Rosenow et al. 1983) als auch nach der Blüte, wobei nach der Blüte die größte Anfälligkeit besteht (Sanchez et al. 2002). Trockentoleranz im post-Anthesis-Stadium ist in einigen Hauptanbauländern von größerem Interesse, da Sorghum in der Regenzeit bzw. am Ende der Regenzeit gesät wird und eine ausreichende Menge Wasser vorhanden sein sollte (Krishnamurthy et al. 2014). Trockenstress verursacht verstärkte Blattseneszenz und das Absterben der Pflanze während der Körnerfüllung (Borrel et al. 2014). Um diese Auswirkung zu vermeiden, wird auf das Merkmal „Stay-green“ selektiert. Dieses ist phänotypisch durch einen auch bei Trockenstress grünen Habitus gekennzeichnet, welcher aus einer angepassten Blattfläche und einem steilen Wurzelwinkel resultiert (Christopher et al. 2014, Borrel et al. 2014). Auf molekularer Ebene wird „Stay-green“ durch das Phytohormon Cytokinin reguliert (Yang et al. 2018). Auch Temperaturen über 35° C, insbesondere im reproduktiven Stadium, führen zu einer verminderten Vitalität der Pollen (Djanaguiraman et al. 2014) und somit zu einem verminderten Kornansatz (Nguyen et al. 2013). Jedoch variiert die genotypische Sensitivität bzw. Toleranz für Hitzestress teils extrem (Nguyen et al. 2013). Zusätzlich zur Toleranz gegen Trocken- und Hitzestress weist Sorghum auch eine Toleranz gegenüber Staunässe auf (Reddy et al. 2011). Einige Sorghum-Akzessionen weisen zudem eine Aluminium- (Kochian et al. 2005) und Salinitätstoleranz auf (Krishnamurthy et al. 2007). Aufgrund der Herkunft aus den semiariden Tropen ist die Anfälligkeit gegenüber Kältestress, insbesondere im frühen Jugendstadium und im frühen reproduktiven Stadium am höchsten (Singh 1985). Kältestress hat einen Einfluss auf fast alle physiologischen Phasen und Entwicklungsprozesse in jungen Sorghum-Pflanzen. Sowohl heterotrophes, als auch autotrophes Wachstum werden beeinflusst (Bekele et al. 2014, Windpassinger et al. 2016). Viele Studien beobachteten eine enorme Variation für Kältetoleranz im Jugendstadium (Singh 1985, Salas-Fernandez et al. 2014, Maulana et al. 2017, Schaffasz et al. 2019b). Akzessionen mit einer ausgeprägten Kältetoleranz stammen meist aus tropischen Bergregionen in Äthiopien, Sudan, Uganda, Burundi, als auch aus Jemen, Russland und China (Singh 1985, Franks et al. 2006, Salas-Fernandez et al. 2014). Zahlreiche Studien haben „Quantitative Trait Loci“ (QTL) identifiziert, die die physiologischen Mechanismen hinter der Kältetoleranz, in bi-parentalen Populationen (Knoll et al. 2008, Burow et al. 2011, Bekele et al. 2013), anhand eines Diversitätssets (Fiedler et al. 2012, 2014, 2016, Upadhyaya et al. 2016, Chopra et al. 2017, Parra-Londono et al. 2018) und mittels eines Nested Association Mapping Designs (NAM) (Marla et al. 2019) beschreiben.

Beim Kältestress sind die Keimung und der Feldaufgang die empfindlichsten Stadien (Pinthus & Rosenblum 1961, Peacock 1982). Diese empfindlichen Stadien können jedoch durch einen angepassten Aussaatzeitpunkt in den Anbaugebieten der gemäßigten Zonen beeinflusst werden (Schaffasz et al. 2019b). Im Gegensatz zum Kältestress im Jugendstadium ist der Kältestress im reproduktiven Stadium weitaus weniger gut erforscht. Auf der Suche nach einer neuen Kastrationsmethode entdeckten Downes & Marshall (1971), dass bei einer Temperatur unter 15° C die männlichen Bestandteile der

Sorghumblüte steril werden. Brooking (1976) erforschte dieses Phänomen weiter und zeigte, dass das frühe meiotische Stadium das Empfindlichste ist (Mendoza-Onofre 1988, Osuna-Ortega et al 2000, Osuna-Ortega et al. 2003, León-Velasco et al. 2009, Cisneros-López et al. 2010, Krishnamurthy et al. 2014).

Neben abiotischen Stressoren existieren noch eine Vielzahl von biotischen Stressoren. Besonders in tropischen und subtropischen Regionen wird Sorghum als Wirt von parasitären Pilzen, Bakterien, Pflanzen und Insekten befallen. Sorghum-Mehltau (*Peronosclerospora sorghi*) ist einer der gefährlichsten pilzlichen Schaderreger, da er schon im Jugendstadium zu einem kompletten Ausfall des Bestandes führen kann. Daneben existieren weitere pilzliche Blattkrankheiten, wie *Ramulispora sorghi*, *Exserohilum turcicum*, etc. Auch Blattflecken können auftreten und werden sowohl von Pilzen (*Colletotrichum graminicola*, *Bipolaris sorghicola*, etc) als auch von Bakterien (*Xanthomonas campestris*, *Burkholderia andropogonis*) verursacht und führen zu hohen Ertragsverlusten (Sleper & Poehlmann 2006). Die Sorghum-Mücke (*Contarinia sorghicola*) und Weizenblattlaus (*Schizaphis graminum*) stellen die weitverbreitetsten Schädlinge dar. Vertreter aus der Gattung *Striga*, *S. hermontica* und *S. asiatica*, parasitieren in den semiariden Gebieten Afrikas und Asiens die Wurzeln von Sorghumpflanzen und führen somit zu einer verminderten Aufnahme von Wasser und Nährstoffen für die Sorghumpflanze (Sleper & Poehlmann 2006). Zudem kann Vogelfraß zu großen Ertragsverlusten führen (Ruskin 1996). Europa ist bislang weitgehend verschont von den meisten oben angesprochenen Sorghum-Krankheiten.

1.5 Züchtung von Sorghum

Die Auslese von individuellen Sorghum Pflanzen für spezielle Umwelten oder Merkmale wurde schon vor Tausenden von Jahren betrieben (Dillon et al. 2007). Ein Beispiel hierfür ist die gezielte Selektion von Pflanzen die keinen vorzeitigen Ausfall des Korns aus der Spelze aufweisen. Dieses Ausfallen des Korns wird durch den „Shattering“ (*Sh1*) Locus kontrolliert. Nur im rezessiven Zustand besteht ein fester Spelzenschluss und das Korn fällt nicht aus (Karper & Quinby 1947).

Sorghum wurde durch den Sklavenhandel von der westafrikanischen Küste an den amerikanischen Kontinent gebracht (Klein et al. 2015). Der erste belegte Anbau von chinesischen Besentypen in Nordamerika wurde um 1750 von Benjamin Franklin durchgeführt. In der Mitte des 19. Jahrhunderts wurden von südafrikanischen Regionen Zucker-Typen gefolgt von Körner-Typen (*miló*, *kafir*, *hegari* und *feterita*) in die USA eingeführt (Poehlmann & Sleeper 2006).

Klein et al. (2008) untergliedert die neuzeitliche Züchtung von Sorghum in fünf verschiedene Phasen. (I) Einfuhr der ursprünglichen Akzessionen (1874 - 1908), (II) Erstellung von heterogenen Populationen und die Selektion von frühen, kurzen Pflanzen (1904 - 1936). Dabei bestand das US-Amerikanische Zuchtmaterial aus nur 20 Zuckertypen und ca. 8 - 10 Korn-Typen. Einige dieser Akzessionen waren

früh blühend und an Langtag-Bedingungen angepasste Akzessionen (Klein et al. 2015), die durch Mutationen in den „*dwarf*“ und „*maturity*“ Genen entstanden. (III) Diese wurden in den 1930er - 1940er für die Mähdrusch-Eignung gezüchtet. „*Wheatland*“ war die erste mähdruschfähige Sorte (ca. 1931). (IV) Die letzten Phasen sind die Saatgut-Produktion (1946 - heute) von Hybridsorten und (V) die Konvertierung (1963 - heute) exotischer Akzessionen von langen, spät blühenden, an Kurztag angepassten Genotypen hin zu kurzen, früh blühenden, photoneutralen Genotypen (Klein et al. 2008).

Mit dem Aufkommen von F₁-Hybriden im Mais wuchs auch das Interesse an Hybrid-Sorten im Sorghum. Im Jahr 1927 beobachteten Conner & Karper (1927) Heterosis für Sorghum. In den 1940er wurde die genetisch männliche Sterilität im Genotyp „*Day Milo*“ genutzt und in Kreuzungen mit „*Blackhull Kafir*“ die erste Generation von Hybriden präsentiert (Quinby 1975). Diese erste Generation von Hybriden hatte einen Ertragsvorteil von bis zu 40% (Klein et al. 2008).

Das cytoplasmatische männliche Sterilitäts-System (CMS) wurde erstmals 1952 beschrieben (Stephens & Holland 1954). Auch die Restauration der männlichen Sterilität wurde in Hybriden mittels der vorhandenen *Rf*-Gene wiederhergestellt. Innerhalb von vier Jahren verdoppelte sich der Ertrag von Kornsorghum in den USA. Hybridsorten nahmen nun fast 100 % der dortigen Anbaufläche ein (Quinby 1975). Dennoch war die genetische Diversität sehr begrenzt und neue Akzessionen waren zu hoch, um sie maschinell zu ernten. Darüber hinaus blühten diese Akzessionen zu spät unter Langtag-Bedingungen, sodass kein keimfähiges Saatgut produziert werden konnte (Poehlmann & Sleeper 2006). Um dieses Problem zu beseitigen, wurde das „Sorghum Conversion Program“ vom United States Department of Agriculture und der „Texas Agricultural Experiment Station“ ins Leben gerufen (Stephens et al. 1967). Die Sorghumzüchter J.C Stephens und J.R Quinby nutzten ein diverses Set aus exotischen Sorghum Akzessionen. In diese wurden die *dw* und *ma* Allele des kurzen Donors „*Tx406*“ eingekreuzt. Hierbei wurden die zwei dominanten Allele für Pflanzenhöhe durch die rezessiven Gegenstücke ersetzt. Hierfür wurde ein Rückkreuzungsschema genutzt. Die Konvertierung des exotischen Materials wurde in Puerto Rico durchgeführt, da hier unter Kurztag-Bedingungen eine Synchronisation der Blüte erreicht werden konnte. Die Elite-Inzuchtlinie „*Tx406*“ wurde dabei als weiblicher Elter und die exotische Akzession als Pollenspender genutzt. Die F₁ Generation musste ebenfalls unter Kurztag-Bedingungen geselbstet werden, da *Ma₁* dominant ist. Die zweite Filialgeneration wurde in einer gemäßigten Umwelt mit Langtag- Bedingungen angebaut. Hierbei wurden diejenigen Pflanzen selektiert, die die gewünschte Allel-Konfiguration hatten (zur Blüte kommen und eine geringe Pflanzenhöhe aufweisen). Das Rückkreuzungsschema wurde fünfmal wiederholt, wobei beim letzten Schritt der exotische Elter den weiblichen Teil darstellte. Letztendlich sollte jede Sorghum-Konversions-Linie zu ca. 98 % mit ihrem exotischen Elter identisch sein (Brown & Paterson 2013). Im Umkehrschluss sollten nur rund 2 % von der Elite-Inzuchtlinie stammen (*ma* und *dw* Allele). Jedoch wurden auf dem Chromosom 6, welches die wichtigsten Gene *ma₁* und *dw₂* enthält (Vordergrund Selektion), relativ große Fragmente des Donorgenoms gefunden (Klein et al. 2008).

Die Produktion von Kornsorghum-Hybriden beruht auf der Nutzung des A₁-Cytoplasmas, welches erstmals 1952 beschrieben wurde (Stephens & Holland 1954). Neben diesem wurden 29 weitere CMS Quellen beschrieben (Schertz 1983). Züchterisch interessant sind unter anderem die Cytoplasmen A₂ und A₃, wobei das A₃ Cytoplasma Ertragsdefizite aufweist und die Auswahl an Restorer oftmals kompliziert ist (Hoffmann & Rooney 2013). Das A₂-Cytoplasma ist, ausgehend von seinen agronomischen Leistungen, vergleichbar mit dem A₁-Cytoplasma. Allerdings müssen hier passende Restorer gefunden werden (Jordan et al. 2011). Zu den bekannten Restorern *Rf1* und *Rf2* wurde 2011 noch *Rf5* identifiziert. Darüber hinaus berichtet auch Kante et al. (2018) über dieses Gen in westafrikanischem Sorghum-Akzessionen. Insbesondere die verheerende Epidemie des „Southern Corn Leaf Blight“ (*Helminthosporium maydis*) am Mais (T-Cytoplasma) zeigte die Konsequenzen, die auftreten können, wenn nur eine einzige Cytoplasmaquelle genutzt wird (Tatum 1971). Nichts desto trotz wird global ausschließlich das A₁-Cytoplasma in der Züchtung von konventionellen Hybridsorten verwendet (Jordan et al. 2011).

Auch bei Biomasse, Futter und *Dual-use* Typen wird die Züchtung von Hybriden genutzt (Ross et al. 1979, Packer & Rooney 2014). Dabei werden die gleichen Cytoplasmen genutzt, die auch für Kornsorghum genutzt werden (Hoffmann & Rooney 2013). Heterosis für Pflanzenhöhe ermöglicht die Produktion von Biomasse-Typen auf kurzen A-Linien (Packer & Rooney 2014). Bei Zuckersorghum ist die Nutzung von Hybridsorten allerdings kompliziert, da der Zuckergehalt ein additives und nicht heterotisches Merkmal darstellt. Deswegen sind beinahe alle angebauten Sorten Linien (Pfeiffer et al. 2010). Bandara et al. (2019) zeigte jedoch, dass bei der Auswahl der richtigen Eltern eine Heterosis für BRIX (Zuckergehalt) gefunden werden kann. Da der Zuckergehalt, aufgrund der fehlenden „Sinks-Konkurrenz“, in sterilen Hybriden des A₃-Cytoplasma höher ist, wird dieses Cytoplasma verstärkt für die Produktion von Hybriden verwendet (Pfeiffer et al. 2010).

Heterosis in Sorghum wirkt sich nicht nur auf den Korn- und Biomasse-Ertrag aus, sondern kann auch für Reife (Kirby & Atkins 1968) und abiotische Stresstoleranzen, wie Kältestress in der Jugendentwicklung (Yu und Tuinstra 2001, Windpassinger et al. 2016) und Kältestress im reproduktiven Stadium (León-Velasco et al. 2009, Schaffas et al. 2019a) ausgeprägt werden. Für eine effiziente Züchtung von Hybriden ist die Nutzung von verschiedenen heterotischen Pools, die eine hohe genetische Divergenz aufweisen, für die Maximierung der Heterosis und einer Steigerung der Generellen Kombinations Eignung (GCA) über die Spezifische Kombinations Eignung (SCA) äußerst wichtig (Reif et al. 2005, Schnable & Springer 2013).

Die Züchtungsmethodik einer Kulturart entwickelt sich stetig weiter. Insbesondere im Hinblick auf die Nutzung von „Next Generation Sequencing Methods“ und Hochdurchsatz Phänotypisierungs Methoden, die genutzt werden können um Merkmals-assoziierte Regionen zu identifizieren und somit den Zuchtwert von Individuen in einer Population zu bestimmen, ist dies der Fall (Varshney et al. 2014).

Um komplexe Merkmale, wie abiotische Stresstoleranzen, mit Sequenz-Variationen in einer hohen Auflösung mit den Phänotypen zu verknüpfen, werden beispielsweise „Nested-Association Mapping“ Populationen (NAM) (Marla et al. 2019) oder „back-cross-NAM“ (BCNAM) genutzt (Jordan et al. 2012). Insbesondere, „Next Generation Sequencing“ Technologien (NGS), wie „restriction associated DNA sequencing“ (RAD-seq) (Nelson et al. 2011) oder „Genotyping-by-Sequencing (GBS)“ (Morris et al. 2013) wurden im Sorghum verwendet, um tausende von Markern im Genom nutzbar zu machen. Durch den Einsatz von NGS-Technologien kann bei Rückkreuzungen eine Hintergrundselektion auf Elite-Material erfolgen. Darüber hinaus ist die Nutzung der „Genomischen Selektion“ (GS), durch NGS möglich. In modernen Zuchtprogrammen wird GS genutzt, um den Zuchtwert einzelner Individuen anhand einer kompletten Population zu schätzen. Für Reis und Mais zeigten GS-Studien, dass eine verbesserte Toleranz gegenüber Hitze- und Trockenstress erreicht werden kann (Yuan et al. 2019, Bhandari et al. 2019, Trachsel et al. 2019). In Sorghum wurde GS verwendet, um die Wuchshöhe in unterschiedlichen Düngestufen vorherzusagen (Watanabe et al. 2017), Biomasse-Merkmale zu verbessern (Fernandes et al. 2018) und den Kornertrag und „Stay-green“ Merkmale zu verbessern (Velazco et al. 2019a). Des Weiteren besteht die Möglichkeit, ein zusätzliches Referenzgenom zu dem ersten Referenzgenom der Elite-Inzuchtlinie „*Btx623*“ von Sorghum zu nutzen (Paterson et al. 2009). Für das neue Referenzgenom wurde die „Sweetsorghum“-Sorte „Rio“ verwendet (McCormick et al. 2018). Cooper et al. (2019) zeigte, dass zwischen den zwei Genomen von „*Btx623*“ und „Rio“ viele Gemeinsamkeiten bestehen, was auf eine Verwandtschaft zwischen Korn- und Zuckersorghum schließen lässt. Jedoch bestehen Unterschiede bei den Signalkaskaden und Regulationsmechanismen im Zuckermetabolismus. Tao et al. (2019) verfolgt die Idee, anstelle einer Genomsequenz auf mehrere Genomsequenzen für Analysen zurückzugreifen, also ein Pan-Genom zu benutzen, welches die komplette Diversität der Art *Sorghum bicolor* widerspiegelt. Ein weiterer Ansatz stammt ebenfalls aus Australien. Es handelt sich dabei um einen QTL-Atlas, der als Online-Plattform frei verfügbar und besonders hilfreich bei der Kandidaten-Gen Analyse ist (Mace et al. 2019). Neben der Steigerung und Weiterentwicklung der genotypischen Werkzeuge, wurden in den letzten Jahren auch die Hochdurchsatz Phänotypisierungs-Methoden weiterentwickelt und verfeinert. So zeigte Watanabe et al. (2017) mit einer Drohne, ausgestattet mit Nah-Infrarot, grün- und blau-Licht Kameras, die Bonitur der Pflanzenhöhe. Die Rispenanzahl ist ein wichtiges agronomisches Merkmal und kann ebenfalls mittels eines unbemannten Vehikels detektiert und gezählt werden. Ghosal et al. (2018) verwendete dabei einen „*deep convolutional neural network*“ (CNN). Chapman et al. (2018) nutzte ein sehendes, mit Nahinfrarot und Spectral Strahlungs Sensoren ausgestattetes unbemanntes Vehikel und bonitierte Merkmale wie Aufgang, Reihenschluss, Bodendeckung, Licht-Interzeption, Strahlungs-Nutzungs-Effizienz, Pflanzenhöhen, morphologische Variation, thermale Bedingungen und Reife.

Ansätze der synthetischen Biologie werden bei Sorghum ebenfalls angewendet. Merkmale, wie Salinitätstoleranz, Tanningehalt, sowie Proteingehalt und Verdaulichkeit werden durch genetische

Transformation verändert und verbessert (Yellisetty *et al.* 2015; Liu *et al.* 2019; Kuriyama *et al.* 2019).

Da Sorghum in vielen Teilen der Welt eine wichtige, diverse und ertragsstabile („*Failsafe*“) Kulturart ist, wird die Weiterentwicklung in den Bereichen NGS, Phänotypisierung und Bioinformatik voranschreiten. Hinzu kommt eine fast unerschöpfliche Anzahl an Genbankakzessionen, die wertvolle Merkmale enthalten und für die Sortenzüchtung nutzbar gemacht werden können. Somit stellt *Sorghum bicolor* für viele Regionen dieser Welt eine wertvolle Ressource dar.

1.6 Bedeutung des Anbaus von Sorghum in Europa

Die Sorghum-Produktion (Kornsorghum) in Europa beträgt 1,6 % der globalen Sorghum-Produktion (<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>). Wegen der geringen Produktion bzw. Anbaufläche spielt Sorghum nur eine untergeordnete Rolle in Europa. Die Hauptanbauländer sind Frankreich, Italien, Ukraine und Russland. Diese vier Länder machen rund 90 % der gesamten Sorghum-Anbaufläche in Europa aus. Im direkten Vergleich der Anbau-Zeiträume 2013 - 2017 und 2008 - 2012 (Kornsorghum) gab es in allen europäischen Hauptanbauländern eine deutliche Steigerung der Produktion. Besonders in Russland und in Österreich ist eine Produktionssteigerung von fast 500 % bzw. 220 % zu erkennen. Die Flächenerträge (t/ha^{-1}) in den europäischen Anbauländern sind, mit Ausnahme von Russland, meist doppelt so hoch wie der globale Durchschnitt ($1,5 \text{ t/ha}^{-1}$). Die Flächenerträge (Kornsorghum) in Italien ($6,6 \text{ t/ha}^{-1}$), Österreich ($6,6 \text{ t/ha}^{-1}$), Frankreich ($5,5 \text{ t/ha}^{-1}$) und Spanien ($5,3 \text{ t/ha}^{-1}$) sind besonders hervorzuheben. Die hohen Erträge sind mit der Nutzung von Hybridsorten zu begründen. Die niedrigeren Flächenerträge in den Ost-Europäischen Staaten sind mit den dort vorherrschenden, eher extensiveren Anbaumethoden zu begründen.

Tabelle 1. Globale Sorghum Produktion und die wichtigsten Produzenten von Kornsorghum in Europa (Quelle: FaoStat).

	Produktion in t (2017)	Anbaufläche in ha (2017)	Anbaufläche in ha (2013- 2017) (Mittelwert)	Produktion in t (2013- 2017) (Mittelwert)	Produktion 2013-2017 relativ zu 2008-2012	Ertrag t/ha^{-1} (2013-2017)
Welt	57601588	40674113	43255266	63485019	106,8	1,5
Europa	944490	295853	365873,2	1186210,8	151,4	3,2
Frankreich	263120	47721	52259	290003,4	107,4	5,5
Italien	240694	40901	46553,4	306434	127,5	6,6
Ukraine	198500	71000	80840	247820	172,3	3,2
Russland	103548	97929	146791,6	200415,8	492,5	1,3
Rumänien	54280	13990	14809,6	42358,6	161,4	2,9
Spanien	30138	6958	7949	41919	134,5	5,3
Österreich	20331	2993	2582	17268	220,5 (2010- 2012)	6,6
Bulgarien	12219	4238	5078	13387,4	221,9	2,6
Ungarn	10826	6387	5065,2	15277,8	141,2	3,1

Die Nutzung von Sorghum als Bioenergie- oder Futter-Pflanze ist ebenfalls in Europa etabliert. Der Höhepunkt des Sorghum-Anbaus für Bioenergie-Nutzung lag Anfang bis Mitte der 2010er Jahre, während des „Biogas-Booms“ und der verheerenden *Diabrotica*-Epidemie (*Diabrotica virgifera*) in Süddeutschland und Südosteuropa. Nach Schätzungen des Deutschen Maiskomitee e. V. (DMK) wurden in Deutschland in den letzten Jahren ca. 10000 ha Sorghum angebaut (<https://www.maiskomitee.de/Sorghum/Statistik>). Im Vergleich dazu wurde Silomais auf einer Fläche von rund 2 Mio. ha angebaut (Beschreibende Sortenliste 2019). Auf dem Großteil dieser Fläche wird Sorghum zur Silonutzung angebaut. Dagegen ist bei Kornsorghum die Anbaufläche gering und beschränkt sich hauptsächlich auf die wärmste Region in Deutschland, den Rheingraben (DMK Broschüre 2019). In der Beschreibenden Sortenliste 2019 sind 7 Sorghum-Sorten aufgeführt, die alle für die Silo-Nutzung geprüft wurden. Die einzige Sorte, die einen kürzeren Habitus aufweist, ist „*Farmsugro 180*“, die noch zu den Korn-Sorghum Typen zugeordnet werden kann. Die letzten Neu-Zulassungen waren 2017 für zwei Sorten. Die größten Sorghum-Anbauflächen (Silo-Nutzung) in Europa befinden sich in Portugal mit 21000 ha und Frankreich mit 10000 ha (siehe Abb. 4). Sortenzüchtung in Europa wird nur von einigen wenigen Firmen, vorwiegend aus Frankreich, durchgeführt. Darunter befinden sich Firmen wie RAGT, Euralis, Semences de Provence, etc. In Deutschland züchtet die KWS vornehmlich Biomasse-Sorten für die deutschen und anderen europäischen Märkte. Aber auch Korn-Sorghum Sorten für Süd-Ost europäische Länder, wie Kroatien, befinden sich im Sortiment des deutschen Pflanzenzuchtunternehmens (KWS: <https://www.kws.com/corp/en/products/sorghum/>).

Mit steigender Anbau-Bedeutung in Europa wurde auch die von der Europäischen Union geförderte Organisation „Sorghum ID“ gegründet. Hier werden in zwölf verschiedenen Sprachen Anbau- und Vermarktungs-Empfehlungen gegeben (<https://www.sorghum-id.com/de/accueil/>).

Der Vorteil von Sorghum, insbesondere von Korn- und *Dual-use* Typen, ist die höhere Ertragssicherheit. Gerade bei langanhaltender Trockenheit weist Sorghum gegenüber Mais und anderen Getreidearten einen deutlichen Ertragsvorteil auf. Die übliche Saat- und Erntetechnik kann verwendet werden. Zudem ist der Nährstoffbedarf geringer. Sorghum benötigt nur 120 kg N pro ha (Richtlinien für die Durchführung von landwirtschaftlichen Wertprüfungen und Sortenversuchen, Sorghumhirse (Silonutzung)). Der Deckungsbeitrag fällt im Vergleich zu Körnermais aber deutlich geringer aus. Trotzdem kann Sorghum, besonders in trockenen Gegenden, eine „*Failsafe*“ Kulturart darstellen und wird weiterhin an Bedeutung gewinnen (DMK Broschüre 2019).

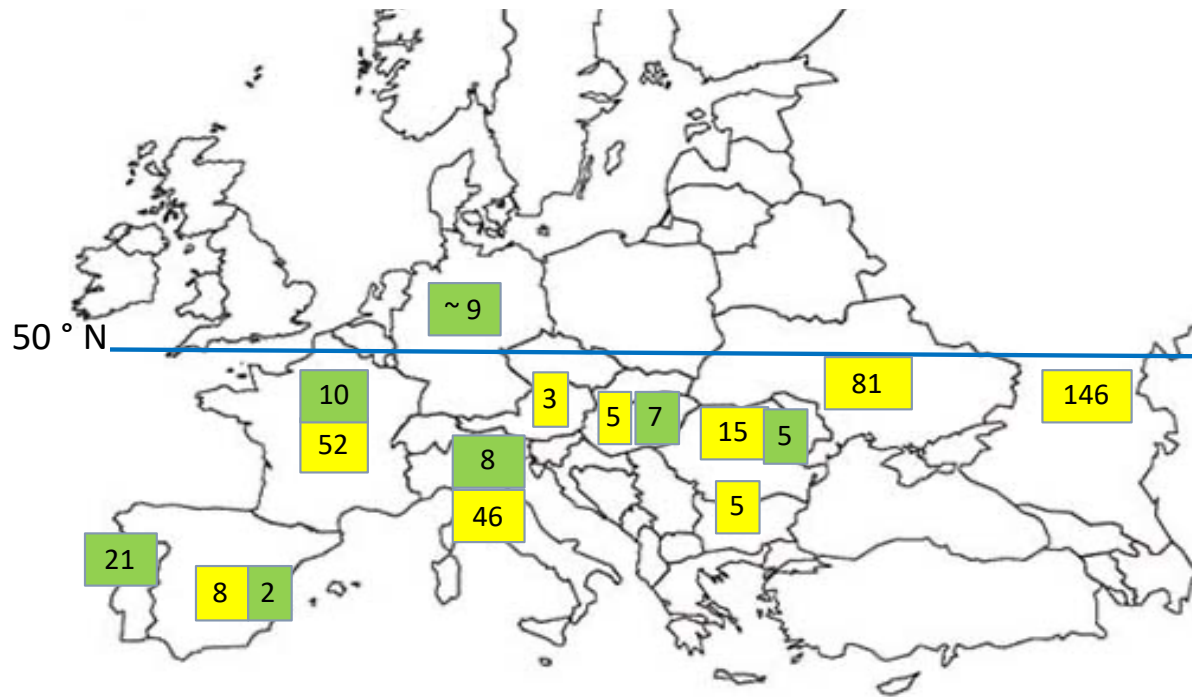


Abbildung 4. Anbauflächen von Kornsorghum (gelb) und Grünschnittsorghum (grün) in Europa (Angaben in Tsd. Hektar). Die blaue Linie zeigt den 50° Breitengrad (FaoStat, gelb Mittelwerte 2013 – 2017, grün Werte aus dem Jahr 2013, sowie Schätzung der deutschen Sorghum Fläche des DMK e.V.).

2 Ziele der Arbeit

Sorghum bicolor ist eine vielseitige Pflanze, die in vielen Teilen und Klimazonen dieser Welt angebaut wird. In Europa hingegen macht die Anbaufläche aktuell nur rund 1,6 % der globalen Anbaufläche aus. In Deutschland stellt *Sorghum bicolor* eine Kulturart dar, die weitestgehend keine große Anbaubedeutung hat.

Diese Thesis hat das Ziel, (I) Forschungs- und Züchtungsarbeiten zu leisten, um Sorghum als alternative Kulturart in Deutschland und Mitteleuropa zu etablieren. Durch den tropischen Ursprung von Sorghum ist es zwingend erforderlich, die Kältetoleranz in der Jugendentwicklung und während der reproduktiven Entwicklungsphasen zu verbessern. In Kapitel 4 wird ein Diversitäts-Set ($n = 338$) genutzt, um neue, hoch tolerante Genotypen zu identifizieren. Ziel ist es, Genotypen zu finden, die sowohl (II) eine hohe Toleranz gegenüber Kältestress in der Jugendentwicklung, als auch akzeptable agronomische Eigenschaften aufweisen und gut an die Zentral-Europäischen Verhältnisse adaptiert sind. (III) Zudem werden Bereiche im Genom identifiziert, die mit einer erhöhten Kältetoleranz assoziiert sind. So ließ sich auf physiologischer Ebene erklären, welche Prozesse für eine verbesserte Toleranz zuständig sind. Das Kapitel 3 beschreibt das zweite, gegenüber Kältestress empfindliche, Entwicklungsstadium.

Die reproduktive Kältetoleranz ist ebenfalls ein wichtiges Zuchtziel, um Sorghum an die in Mitteleuropa vorherrschenden, klimatischen Bedingungen anzupassen. Wichtig ist hierbei, ob das Merkmal heterotisch ist und wie es vererbt wird. Die Identifizierung von neuen, hoch toleranten Genotypen aus einem Diversitäts-Set ist ebenfalls von großer Bedeutung. Nur eine Sorte mit einer schnellen Jugendentwicklung, auch unter sub-optimalen Bedingungen, und einem hohen Maß an reproduktiver Kältetoleranz kann auf lange Sicht mit der vergleichbaren Kulturart Mais konkurrieren und Vorteile, wie die bessere Nährstoffeffizienz und Trockentoleranz, ausspielen.

Kapitel 3

Publikation I

‘Reproductive Cold Stress Tolerance in Sorghum F1 Hybrids is a Heterotic Trait’

André Schaffasz, Steffen Windpassinger, Rod Snowdon and Benjamin Wittkop
(2019)

Publiziert in:

Agronomy 2019, 9, 508; doi:10.3390/agronomy9090508

Zusammenfassung

In dieser Veröffentlichung wurde die Bedeutung der Heterosis und der Hybridzüchtung für die Adaptation von Sorghum an kühlere Klimazonen beschrieben. Hierzu wurde eine Factorial bestehend aus $n = 49$ Hybriden und deren Eltern-Linien an sechs unterschiedlichen Umwelten über die Jahre 2017 und 2018 getestet. Es zeigte sich, dass die Kältetoleranz im reproduktiven Stadium dominant vererbt wird. Zukünftig von Vorteil wäre die Entwicklung von weiteren eigenen Mutterlinien. Zudem sollte bei der Auswahl von Hybrideltern bei beiden Komponenten eine ausreichend hohe Toleranz vorliegen, um tolerante Hybriden zu erhalten.

Article

Reproductive Cold Stress Tolerance in Sorghum F₁ Hybrids is a Heterotic Trait

André Schaffas ¹, Steffen Windpassinger ^{1,2,*}, Rod Snowdon ¹ and Benjamin Wittkop ¹

¹ Department of Plant Breeding, Research Centre for Biosystems, Land Use and Nutrition (IFZ), 35392 Giessen, Germany

² NPZ Innovation GmbH, Hohenlieth-Hof, 24363 Holtsee, Germany

* Correspondence: steffen.m.windpassinger@agrar.uni-giessen.de; Tel.: +49-641/9937443; Fax: +49-641/9937429

Received: 28 June 2019; Accepted: 30 August 2019; Published: 3 September 2019



Abstract: The sensitivity of sorghum to pre-flowering cold stress, resulting in reduced pollen viability and poor seed set, is a major constraint for expanding growing areas into higher altitudes and latitudes. Nevertheless, compared to juvenile cold tolerance, reproductive cold tolerance in sorghum has received much less attention so far, and very little is known about its inheritance in F₁-hybrids. We have composed a representative factorial ($n = 49$ experimental F₁-hybrids) for a comprehensive study on heterosis and combining ability for crucial tolerance traits as spikelet fertility (*panicle harvest index*), seed yield and pollen viability, using field trials in stress- and control environments in Germany and Mexico as well as climate chamber experiments. Our results indicate a heterotic and rather dominant inheritance of reproductive cold tolerance in sorghum, with strong effects of female general combining ability (GCA) on F₁-hybrid performance in our material. These findings, together with the comparatively low contribution of specific combining ability (SCA) effects and high heritability estimates, suggest that robust and efficient enhancement of reproductive cold tolerance is feasible via hybrid breeding.

Keywords: reproductive cold tolerance; sorghum hybrid breeding; combining ability; heterosis; pollen fertility; spikelet fertility; panicle harvest index

1. Introduction

The sensitivity of sorghum (*Sorghum bicolor*(L.) Moench) as an originally tropical C₄-plant to temperatures below 15 °C substantially obstructs its successful implementation into both high-latitude temperate climates and tropical high-altitude areas [1]. Early juvenile development [2] and pre-flowering reproductive stage [3] are considered the most critical growth stages. While several recent studies have targeted enhancements of juvenile cold tolerance (e.g., [3,4]) and shown its heterotic character [5,6], comparably little research has focused on reproductive cold tolerance of sorghum to date. However, for adaption of sorghum into temperate climates such as Central Europe, this trait is at least equally important [7]. While farmers can opt for later sowings to avoid juvenile cold stress (even though on the expense of the available growth period and yield potential), there is no escape strategy for cold spells during reproductive stage, which can induce male sterility leading to reduced or even no seed set and grain yield.

Downes and Marshall [8] firstly described, in search of a new crossing method, the occurrence of male sterility in sorghum after a cold treatment (13 °C). Problems of meiosis in motherspore cells were described as a possible reason for this phenomenon [3]. Singh [1] measured reproductive chilling tolerance in a set of 380 accessions, and identified tolerance sources originating mainly from Ethiopia, Uganda, the USA and China. Furthermore, this was also the first study giving some information on the inheritance of this trait using factorial F₁ hybrids. Several Mexican studies [9–13] deal with

the breeding of cold tolerant grain sorghum hybrids for the Mexican High Valleys (>2000 m a.s.l.), where cold nights prevail throughout the season. In this context, Leon Velasco et al. [12] described heterosis for the traits grain yield, seed weight and seed number in sorghum F₁ hybrids under cold stress. Krishnamurthy et al. [14] evaluated the reproductive cold tolerance of sorghum under the Indian post-rainy season and suggested the trait *Panicle Harvest Index* (PHI), which represents the level of seed set per panicle, calculated as ratio between seed yield (after threshing) and whole panicle weight (before threshing) as an efficient score for spikelet fertility.

The production of a high pollen number with sufficient vitality also at lower temperature is considered to be the underlying physiological process to ensure seed set under cold stress in sorghum [11] and other tropical crops like chickpea [15] and rice [16,17]. While in the past the screening of pollen vitality traits based on staining techniques was labor-intensive and tedious, nowadays, the impedance flow cytometry [18] provides an efficient novel tool for a fast screening of a higher number of genotypes.

Since the discovery of a cytoplasmic male sterility (CMS) system and corresponding fertility restorers [19], commercial sorghum breeding is mainly focused on the development of F₁-hybrid varieties. Heterosis in sorghum is not only expressed for yield, but also for maturity [20] and abiotic stress tolerance, including juvenile cold tolerance [5,6,21]. The goal of this study is to assess whether breeding for reproductive cold tolerance can also rely on heterosis, aiming at the design of efficient hybrid breeding strategies to enhance this trait. In this regard, a better understanding of combining ability and the relation between *per se* and hybrid performance is of special interest.

2. Material and Methods

2.1. Germplasm

The plant material utilized in this study comprised a 7 × 7 factorial (half-diallele mating scheme), consisting of seven seed parent lines (*females*), seven restorer (pollinator) lines (*males*) and their 49 factorial F₁-hybrids. Regarding the females, the sterile A-lines (CMS-lines with A₁-cytoplasm) were only used to produce the F₁-hybrid seeds in hand-crosses, while their corresponding isogenic fertile B-lines (*maintainer*) were measured in the experiments. These parental lines have diverse pedigrees and are grain or dual-purpose types (100–160 cm tall) originating from a running breeding program of Norddeutsche Pflanzenzucht Hans-Georg Lembke KG (NPZ) and Deutsche Saatveredelung AG (DSV). They were selected for this study due to (i) their different levels of reproductive cold tolerance shown in former experiments, aiming at a diverse, representative selection; (ii) their similar maturity, to minimize the influence of different weather conditions at critical growth stages distorting the results; (iii) their similar panicle architecture, being all of the *Sorghum bicolor*(L.) Moench subspecies *caudatum* and *kafir* or their intermediate types with semi-compact panicles, which can possibly reduce the impact of different panicle compactness on PHI values under control conditions (for this reason, no material with extremely open or compact panicles, like *Sorghum bicolor*(L.) Moench subspecies *guinea* or *durra*, was utilized). However, due to the limited seed availability of some hybrids, the factorial was not complete in all environments.

2.2. Field Trials

Field trials were conducted at six locations (four in Germany and two in Mexico, Table 1) which represent different mega-environments. Among the German locations, Asendorf (located in NW-Germany) and Poel (a small island in the Baltic Sea) have a cool maritime climate, whereas Rauischholzhausen (located in a low mountain range landscape in Hesse) is characterized by a more continentally influenced climate with tendency to cold nights in late summer. Usually, all these locations provide harsh conditions for sorghum. However, the summer of 2018 was unusually hot in Central Europe, so that no cold stress was observed in the experiments of Poel (2nd year) and Rauischholzhausen. Gross-Gerau, the fourth German location, is located in the Upper Rhine Valley

and characterized by a warm and sunny climate, being a suitable control environment without cold stress. The locations in Mexico represent very contrasting environments to Germany, having shorter days during the growing season, but a much stronger radiation. While San Juan del Río (1920 m, federal state Querétaro) is considered to be at the altitude limit for commercial sorghum cultivation in Mexico, Texcoco (2250 m, federal state México) is a tropical high-altitude stress environment for sorghum, providing the lowest minimum temperatures of all locations.

Table 1. Overview and climate data of the different environments during the duration of the experiments (from sowing until harvest of the panicles, i.e., May until September or October).

Site	Coordinates	Altitude	Soil Type	Year	Mean Temp. (°C)	Mean Max. Temp. (°C)	Mean Min. Temp. (°C)	Absolute Max. and Min. Temp. (°C)	Precipitation (mm)
Poel (PO)	53°99' N, 11°47' E	19 m	Loamy sand	2017	16.7	20.2	13.1	29.5/6.6	301
				2018	18.7	23.2	14.2	35.6/6.4	118
Rauischholz-Hausen (RH)	50°46' N, 8°53' E	270 m	Loam	2018	18.7	26.5	10.9	37.9/−0.3	174
Asendorf (AS)	52°46' N, 9°01' E	49 m	Loamy sand	2017	16.1	21.0	11.6	31.7/5.1	611
Gross-Gerau (GG)	49°55' N, 8°29' E	90 m	Sand	2018	21.3	28.9	13.7	38.8/5.3	94 (+150 irrigation)
San Juan del Río (SJR)	20°25' N, 99°56' W	1920 m	Loam	2017	23.0	31.4	14.7	36.6/11.6	326
Texcoco (TEX)	19°31' N, 98°51' W	2250 m	Loam	2017	16.4	24	8.7	27.0/−2.4	360

At all sites, the groups' parental and hybrids were grown in adjacent, but separate blocks to avoid shading of the shorter parental by the taller hybrids. Within the groups, an unreplicated randomized complete block design (RCBD) was used. Entries were grown in single rows (2.5 × 0.7 m) at Gross-Gerau, and in double rows (2.5 × 1.4 m) at all other sites, with 0.7 m row spacing and a plant density of approx. 20 plants/m². Plant protection and fertilizer application were executed following good agronomical practice. Per entry, the primary panicles of five healthy plants were covered before anthesis with a transparent Cryovac[®] bag (330 mm × 750 mm, 15 µm) (Sealed Air[®], Charlotte, NC, USA) to avoid cross pollination. These five self-pollinated panicles were considered as biological replications for further analyses. At maturity, they were harvested with secateurs and dried. The peduncles of each panicle were cut just below the first branches before determining the panicle weight. Subsequently, the *Panicle Harvest Index* (PHI) was calculated according to Krishnamurthy et al. [14]:

$$\text{PHI} = \text{grain dry weight (i.e., seed yield per panicle)} / \text{panicle dry weight (before threshing)} \quad (1)$$

Consequently, a PHI value of 0 implies absolutely no seed set, while values close to 1 indicate a high seed set. However, even assuming complete spikelet fertility, PHI will be < 1, due to the panicle raw weight. In addition, grain number was measured using seed-counter Contador (Pfeuffer GmbH, Kitzingen, Germany).

2.3. Climate Chamber Experiments

Climate chamber experiments were carried out at the IFZ Research Centre for Biosystems at the Justus Liebig University Giessen. Five representative hybrids (out of the factorial $n = 49$) with different cold tolerance and their parental lines (three females and four males) were tested under controlled cold stress conditions during the reproductive phase. Temperature (24 °C day/7 °C night) and light (13 h day/11 h night, Table 2) settings of the stress treatment were chosen to resemble cold spell scenarios during late summer. Per entry, ten plants were grown in adequate-sized pots (15 × 15 × 20 cm, one plant per pot) filled with high quality soil (Fruhsdorfer soil type NTM). After cultivation at optimal temperature conditions (30/24 °C) during vegetative growth, one half of the

plants was transferred to a separate chamber and exposed to cold stress from flag-leaf-stage (BBCH 39, described by Brooking [3] as most sensitive stage) until the start of grain filling stage (BBCH 71), while the other half of the plants remained at 30/24 °C (control treatment). Before anthesis, panicles were covered with a transparent Cryovac® bag (330 mm × 750 mm, 15 µm) to avoid cross pollination. In addition, here, the panicles of individual plants (five per treatment) were considered as biological replications. Under both treatments, plants were sufficiently watered and fertilized to exclude any other than thermal stress.

Table 2. Settings of the climate chamber experiments.

	Temperature in Celsius	Day/Night Cycle in Hours	Rel. Air Humidity
Control Treatment	30/24	16/8	60%
Stress Treatment	24/7	13/11	60%

At seed maturity, panicles were harvested and dried to score PHI and grain number per panicle as previously described.

2.4. Pollen Analyses via Amphasys® Impedance Flow Cytometry

To quantify the amount and the viability of the pollen on both stressed and not stressed plants, we used the impedance flow cytometry (IFC), manufactured by Amphasys® AG (Amphasys® AG, Root, Switzerland), as a fast and non-invasive technique. It measures electrical capacity (and hence viability) of a cell, utilizing a small microfluidic chip where the pollen grains flow through and the electric charge of the cells is measured via different radio frequencies [18].

For the field trials in Gross-Gerau and Rauischholzhausen, 21 factorial hybrids and their parental lines (three females and seven males) were analyzed by IFC, while in the climate chamber experiments, five hybrids and their parental lines (as previously described) were measured for pollen traits. Per genotype, four plants (i.e., replications) were sampled in the field trials, while in the climate chamber experiments ten plants were analyzed (five under the control- and five under the stress treatment). For sample preparation, three florets from each plant were taken in both field and climate chamber experiments. As anthesis in sorghum panicles proceeds from the tip downwards within several days, for sample collection, the panicle region just below the currently flowering florets was chosen. The florets were cut with a scissor and kept cool until IFC measurements were started shortly afterwards. Subsequently, the anthers were gently squeezed from the florets with a tweezer and transferred into a 2 mL-tube filled with 1 mL AF6-buffer. After crushing the anthers with a pipette-tip, the tube was shaken and the solution was filtered (using 100 µm filters) into a fresh 2 mL-tube. For the IFC measurements, the recommended default settings from Amphasys® based on the average sorghum pollen size were utilized, analyzing samples at 2 and 12 Mhz. However, since measurement results at both frequencies were extremely similar, only the results obtained at 2 Mhz are regarded in this manuscript. To determine the pollen amount, i.e., the total cell number including both dead and alive cells, the whole sample volume was soaked into the device and the concentration (cells/mL) was recorded until there was no change in cell concentration anymore (approx. 90 s). Furthermore, the viable pollen number was also analyzed. For this purpose, a negative control was used as dead-sample, in which the pollen had been devitalized by exposure to 95 °C for 5 min in a Thermomixer (Eppendorf Thermomixer comfort, Eppendorf AG, Hamburg, Germany). Results were analyzed with Amphasoft 2.0 (Amphasys® AG, Root, Switzerland) using the gating adjustment method, in which the negative control was used as a marker for the gating threshold. With this setting, all measuring points to the left hand of the gating threshold are recognized as dead and all dots to the right-hand site are recognized as alive.

2.5. Statistical Analyses

For statistical analyses, a general linear model was used, in which genotypes, females, males and environments (combination of location and year) were considered as fixed and replications (individual plants) as random effects. Interaction between females and males was used to compute the specific combining ability (SCA) variance [5].

The heritability was calculated as proposed by Piepho and Möhring (2007) [22] using the following formula:

$$H^2 = \frac{\sigma_G^2}{\sigma_G^2 + \frac{1}{2}vd} \quad (2)$$

where H^2 represents broad-sense heritability, σ_G^2 is the genotypic variance calculated by a random effect model considering genotype and environment as random factors, and vd is the average variance of the difference between two means.

Analysis of Variances (ANOVA) of lines vs. hybrids was utilized to test for significance of mid-parent heterosis (MPH). A Student-Newman-Keuls Test (SNK) was applied to determine genotype subsets being significantly different from one another, identifying cases of significant high-parent heterosis (HPH). The general combining ability (GCA) was calculated according to established methods [23]. The prediction accuracy of GCA for hybrid performance was described by the coefficient of determination (r^2) between the sum of parental GCA effects and actual hybrid performance [6,24]. Statistical analyses were conducted using IBM SPSS Statistics version 23 (IBM Software, Armonk, NY, USA).

3. Results

3.1. Variation for SeedSet in Field Trials

The temperature conditions and consequently the level of cold stress differed strongly among the field environments (see climate data in Table 1 and Figure 1), which is also demonstrated by the highly significant environment effect on the traits (Table 3). The environments of Texcoco, Asendorf and Poel 2017 showed a strong reduction of the average PHI compared to environments without thermal stress as Gross-Gerau, San Juan del Río and Poel 2018 (Figure 2, Tables S1 and S5). However, even under these harsh conditions, some males and hybrids still attained high PHI values. Consequently, the environments of Asendorf, Texcoco and Poel 2017 were considered as stress environments for further analyses, while Gross-Gerau, San Juan del Río and Poel 2018 were regarded as control environments.

Highly significant differences among the entries for the measured seed set traits were observed in both environmental groups. Considering lines and hybrids separately to exclude possible masking heterotic effects, differences still remained highly significant. Under stress conditions, males as a group performed significantly better than females (Table 3, Figure 2). As expected, the coefficient of variation was higher for the group stress environments (Table 3). Genotype $\times$ environment interactions were significant for all groups of entries (lines, males, females and hybrids) and environments (stress and control field environments). For the group stress environments, genotypic variance was much higher than genotype $\times$ environment variance, leading to high heritability estimates for all traits ($H^2 = 0.83$ in average for both lines and hybrids). In comparison, the relative impact of genotype $\times$ environment interaction was higher for the group control field environments, and heritability was consequently somewhat lower.

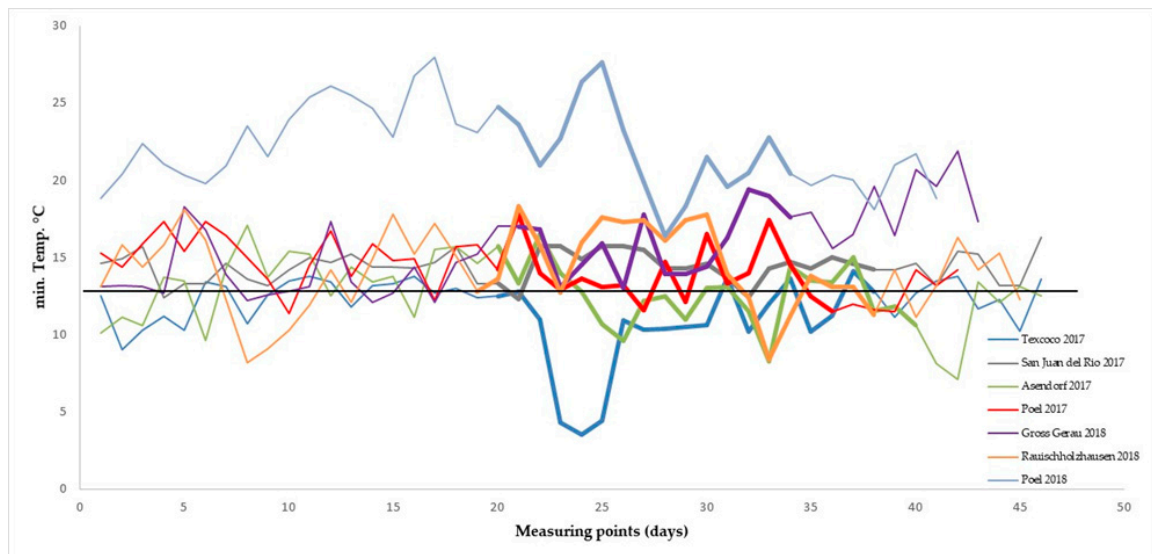


Figure 1. Course of minimum temperatures at the different environments, shown for the time period between 20 days before anthesis of the earliest entry and seven days after anthesis of the latest-flowering entry. The duration of anthesis at the respective locations is indicated by bold graphs. The black horizontal line indicates 13 °C.

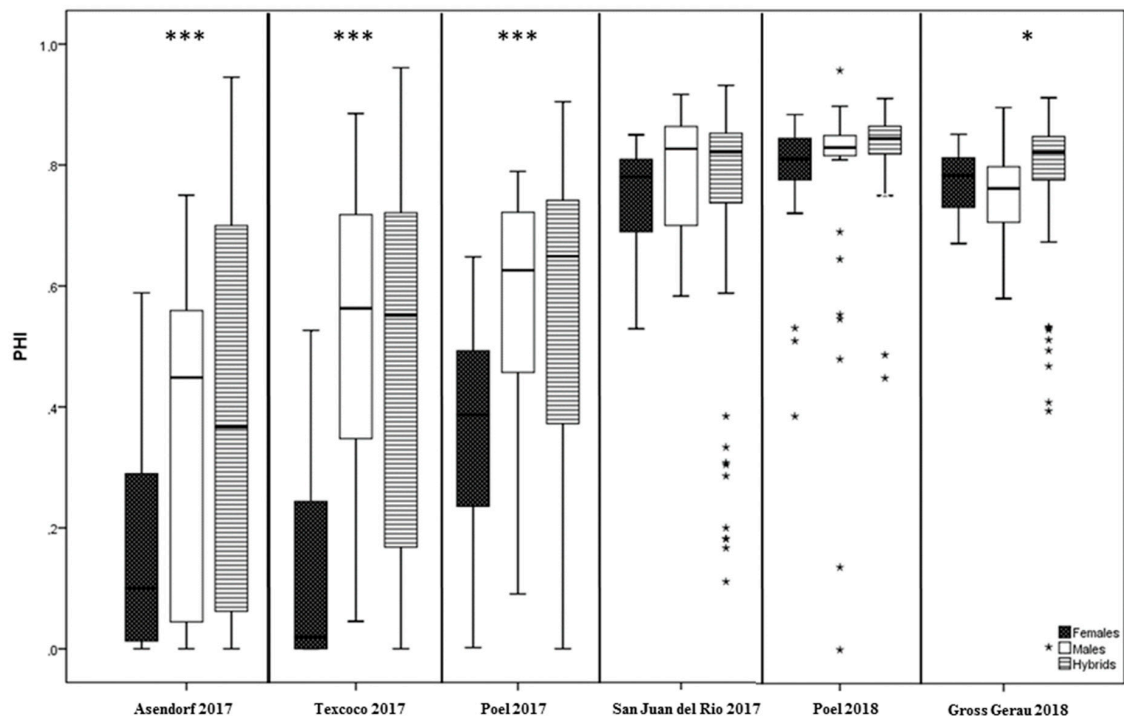


Figure 2. Boxplots showing the panicle harvest index (PHI) of female lines, male lines and their hybrids at the six field environments. * Significant at 0.05 level; ** Significant at 0.01 level; *** Significant at 0.001 level. Significance levels refer to differences between the group hybrids and lines (females and males).

Table 3. Genotypic variances (mean squares) and their environmental interaction for the traits seed yield per panicle (g), seed number and panicle harvest index (PHI). (Stress environments: Asendorf, Poel 2017, Texcoco; control environments: Gross-Gerau, Poel 2018, San Juan del Río).

Items	All Environments				Stress Environments				Control Environments			
	d.f.	Seed Yield Per Panicle (g)	Seed Number	PHI	d.f.	Seed Yield Per Panicle (g)	Seed Number	PHI	d.f.	Seed Yield Per Panicle (g)	Seed Number	PHI
Entries	61	4263.81 ***	5,520,078.55 ***	0.42 ***	54	1995.35 ***	3,475,582.26 ***	0.70 ***	61	3534.64 ***	3,700,130.29 ***	0.06 ***
CV Entries		2.18	1.93	1.05		3.15	2.80	1.95		1.37	1.15	0.31
Environments (Env)	5	59,090.35 ***	79,477,724.73 ***	9.26 ***	2	7634.70 ***	21,494,186.41 ***	1.91 ***	2	2724.82 ***	16,577,269.0 ***	0.23 ***
Entries × Env	259	689.00 ***	859,084.66 ***	0.1 ***	100	234.20 ***	459,181.84 ***	0.10 ***	110	950.32 ***	1,032,507.28 ***	0.03 ***
Error	1158	123.6	157,059.12	0.01	521	46.44	77,405.71	0.01	661	179.93	213,954.88	0.01
Heritability (H^2)		0.83	0.84	0.75		0.87	0.86	0.85		0.72	0.7	0.57
Lines	13	1159.35 ***	1,972,584.96 ***	0.36 ***	13	492.79 ***	943,314.11 ***	0.66 ***	13	1415.42 ***	1,970,893.33 ***	0.06 ***
CV Lines		1.72	1.57	1.07		2.97	2.38	2.32		1.20	1.05	0.32
Environments (Env)	5	11,348.65 ***	18,701,493.15 ***	3.04 ***	2	927.90 ***	3,878,005.31 ***	0.69 ***	2	2658.51 ***	75,731,121.65 ***	0.01
Lines × Env	61	384.38 ***	572,938.83 ***	0.08 ***	25	65.17 ***	170,723.20 ***	0.09 ***	26	519.92 ***	813,648.57 ***	0.03 ***
Error	295	64.69	118,969.66	0.01	148	14.05	33,708.51	0.01	163	104.32	184,820.95	0.01
H^2		0.65	0.71	0.77		0.85	0.8	0.85		0.85	0.8	0.85
Males	6	1501.12 ***	2,098,936.97 ***	0.49 ***	6	633.35 ***	1,132,878.41 ***	0.62 ***	6	1457.84 ***	1,646,223.05 ***	0.08 ***
CV Males		1.94	1.63	1.13		2.41	2.10	1.64		1.30	1.02	0.37
Environments (Env)	5	4172.49 ***	7,700,134.83 ***	0.92 ***	2	802.86 ***	2,288,173.25 ***	0.29 ***	2	513.53 **	3,346,600.43 ***	0.02
Males × Env	30	418.34 ***	587,861.50 ***	0.08 ***	12	85.62 ***	218,893.87 ***	0.08 ***	12	678.15 ***	933,770.85 ***	0.04 ***
Error	157	63.49	87,720.17	0.01	78	17.82	34,379.41	0.01	81	105.9	136,920.52	0.01
H^2		0.73	0.73	0.81		0.88	0.79	0.87		0.58	0.47	0.53
Females	6	964.95 ***	2,102,749.73 ***	0.17 ***	6	134.0 ***	607,000.85 ***	0.32 ***	6	1485.72 ***	2,377,031.89 ***	0.04 ***
CV Females		1.60	1.61	0.81		2.72	2.62	2.57		1.16	1.08	0.26
Environments (Env)	5	7849.99 ***	12,241,455.85 ***	2.31 ***	2	230.84 ***	1,659,332.93 ***	0.51 ***	2	3022.14 ***	6,286,193.59 ***	0.01
Females × Env	26	283.93 ***	427,133.83 ***	0.06 ***	11	36.99 ***	131,383.11 ***	0.08 ***	12	310.17 **	494,212.78 *	0.02 ***
Error	138	66.059	154,521.623	0.007	70	9.86	32,960.94	0.01	82	102.76	232,137.23	0.003
H^2		0.65	0.71	0.77		0.47	0.76	0.66		0.79	0.8	0.57
F vs. M		17.330	14,409.571	1.232 ***	1	1885.67 ***	2,060,061.57 ***	3.19 ***	1	747.27	1,455,133.58	0

Table 3. Cont.

Items		All Environments				Stress Environments				Control Environments			
Hybrids (H)	47	4312.99 ***	5,845,056.24 ***	0.44 ***	40	2228.03 ***	3,977,574.78 ***	0.70 ***	47	3411.13 ***	3,723,235.56 ***	0.06 ***	
CV Hybrids		1.96	1.82	1.02		2.83	2.61	1.81		1.24	1.09	0.31	
Environments (Env)	5	49,111.22 ***	62,037,528.31 ***	6.30 ***	2	6901.22 ***	17,764,234.16 ***	1.27 ***	2	2522.91 ***	12,040,802.69 ***	0.25 ***	
Hybrids x Env	193	760.60 ***	938,533.24 ***	0.10 ***	73	290.83 ***	562,860.35 ***	0.11 ***	82	1047.37 ***	1,057,291.96 ***	0.03 ***	
GCA (F)	6	12,602.34 ***	23,111,079.88 ***	1.89 ***	6	4359.36 ***	10,771,964.45 ***	2.62 ***	6	14,651.5 ***	19,470,675.5 ***	0.34 ***	
GCA (M)	6	8273.90 ***	7,254,811.86 ***	0.30 ***	6	5752.50 ***	7,628,863.68 ***	0.64 ***	6	4299.45 ***	1,739,162.29 ***	0.02 ***	
Ratio GCA F: M		1.52	3.18	6.3		0.76	1.41	4.09		3.41	11.20	14.78	
SCA (F x M)	35	1015.06 ***	1,152,137.36 ***	0.07 ***	28	380.65 ***	613,548.49 ***	0.11 ***	35	1284.52 ***	1,277,323.82 ***	0.02 ***	
Env x GCA (F)	30	1862.58 ***	1,507,934.05 ***	0.28 ***	12	356.82 ***	455,922.27 ***	0.18 ***	12	2804.65 ***	1,886,401.36 ***	0.09 ***	
Env x GCA (M)	30	424.13 ***	1,101,327.01 ***	0.11 ***	12	232.56 ***	731,861.38 ***	0.11 ***	12	576.51 ***	836,901.45 ***	0.01	
Env x SCA	133	554.90 ***	729,432.51 ***	0.05 ***	49	276.75 ***	498,152.1 ***	0.08 ***	58	733.09 ***	886,435.04 ***	0.02 ***	
Error	863	143.74	170,079.27	0.01	373	59.29	94,744.02	0.01	498	204.68	223,490.68	0.01	
H ²		0.8	0.81	0.74		0.83	0.81	0.85		0.67	0.69	0.58	
L vs. H	1	51,085.44 ***	46,330,361.32 ***	1.1 ***	1	12,047.69 ***	17,365,106.10 ***	1.53 ***	1	38,709.27 ***	28,897,161.25 ***	0.15 ***	

* Significant at 0.05 level; ** Significant at 0.01 level; *** Significant at 0.001 level.

3.2. Variation for PHI and Pollen Traits in Climate Chamber Experiments

Under climate chamber conditions, the stress treatment caused a highly significant reduction of the PHI as compared to the control treatment (0.56 vs. 0.80 in average, Table 4, Table S6), while surprisingly no reduction of pollen amount and viable pollen due to cold was detectable. Nevertheless, highly significant differences among the entries were observed for PHI and the measured pollen traits as well. However, for the control treatment, differences were only significant among the lines. For the stress treatment, variance for pollen traits was again much higher for the lines than for the hybrids, but, surprisingly, for PHI, it was vice versa (Figure 3). Genotype $\times$ treatment interaction was significant and even higher than genotypic variance for the hybrids. Interestingly, the heritability was higher for pollen amount ($H^2 = 0.83$) than for viable pollen and PHI ($H^2 = 0.25$ and 0.40 , respectively).

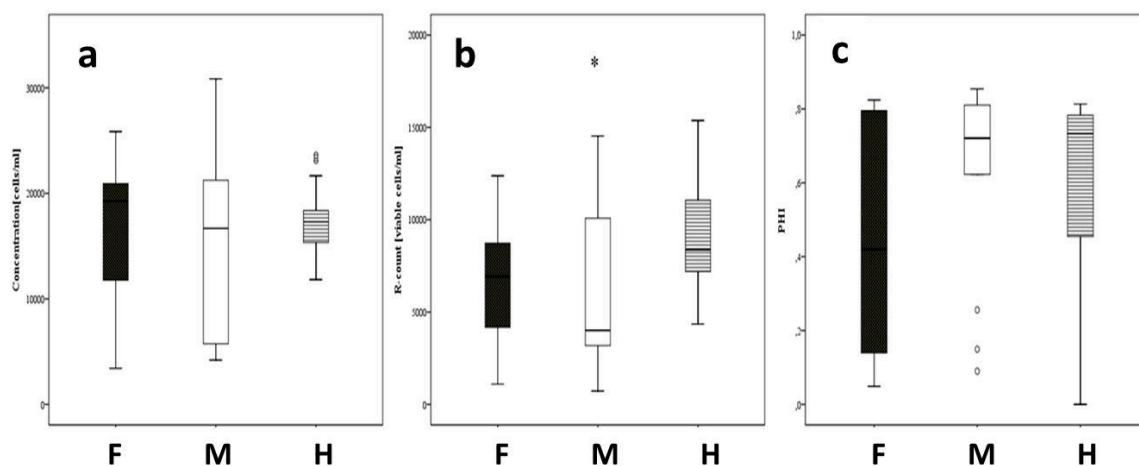


Figure 3. Boxplots showing the pollen amount (cells/mL) (a), viable pollen number (cells/mL) (b), and panicle harvest index (c) for female lines, male lines and their hybrids for the climate chamber stress treatment the ratio between PHI stress / PHI control is 0.29 for females, 0.6 for males and 0.7 for hybrids. * Significant at 0.05 level; ** Significant at 0.01 level; *** Significant at 0.001 level. Significance levels refer to differences between the groups hybrids and lines (females and males). F = female lines; M = male lines; H = hybrids

3.3. Analysis of Pollen Traits via IFC for the Field Trials in Gross-Gerau and Rauischholzhausen

Pollen traits were also scored in the field experiments of Gross-Gerau and Rauischholzhausen 2018. Since no cold stress occurred during this season, these experiments are regarded as 'control field environments as previously outlined. Nevertheless, the entries ($n = 31$) showed highly significant differences for the scored traits pollen amount and viable pollen within all groups (lines, females, males and hybrids, Table 5, Table S3). Vice versa to the climate chamber experiments, under field conditions, the heritability was higher for viable pollen than for pollen amount (Table 5).

Table 4. Genotypic variances (mean squares) and their treatment interaction for the traits pollen amount (cells/mL), viable pollen number (cells/mL) and panicle harvest index (PHI) for the climate chamber experiments.

Both Treatments				Stress Treatment				Control Treatment				
Items	d.f	Pollen Amount (Cells/mL)	Viable Pollen (Cells/mL)	PHI	d.f.	Pollen Amount (Cells/mL)	Viable Pollen (Cells/mL)	PHI	d.f.	Pollen Amount (Cells/mL)	Viable Pollen (Cells/mL)	PHI
Entries	11	189 mio ***	54 mio ***	0.21 ***	11	137 mio ***	41 mio ***	0.294 ***	11	87 mio ***	55 mio ***	0.034 ***
Treatment	1	70 mio *	2 mio	1.63 ***								
Entry × Treatment	11	34 mio *	36 mio ***	0.124 ***								
Error	89	15 mio	7 mio	0.016	42	10 mio	6 mio	0.026	47	20 mio	8 mio	0.007
H ²		0.83	0.25	0.40								
Lines	6	340 mio ***	83 mio ***	0.23 ***	6	232 mio ***	57 mio ***	0.27 ***	6	154 mio ***	92 mio ***	0.06 ***
Lines × Treatment	6	58 mio *	54 mio ***	0.072 **								
Error	49	20 mio	7 mio	0.022	21	114 mio	4 mio	0.029	27	27 mio	10 mio	0.01
H ²		0.83	0.27	0.66								
Males	3	519 mio ***	91 mio ***	0.104 **	3	318 mio ***	83 mio ***	0.17 *	3	270 mio **	92 mio **	0.003
Males × Treatment	3	81 mio *	75 mio **	0.1 **								
Error	26	26 mio	11 mio	0.016	10	12 mio	4 mio	0.037	16	35 mio	16 mio	0.002
Females	2	242 mio ***	77 mio ***	0.41 ***	2	2158 mio	48 mio	0.484	2	43 mio	32 mio ***	0.09
Females × Treatment	2	42 mio	3 mio	0.062								
Error	23	13 mio	3 mio	0.029	11	9 mio	5 mio	0.021	11	17 mio	1 mio	0.02
F vs. M	1	157,570	129 mio **	0.44 **	1	7 mio	257,664	0.16	1	26 mio	216 mio **	0.185 ***
Hybrids	4	8 mio	12 mio	0.22 ***	4	5 mio ***	9 mio **	0.41 ***	4	8 mio	13 mio	0.001
Hybrids × Treatment	1	69 mio *	31 mio	0.23 ***								
Error	40	10 mio	8 mio	0.009	19	11 mio	9 mio	0.013	20	9 mio	6 mio	0.005
H ²		0.83	0.25	0.40								
L vs. H	1	2 mio	23 mio	0.004	1	17 mio	70 mio *	0	1	6 mio	2 mio	0.001

* Significant at 0.05 level; ** Significant at 0.01 level; *** Significant at 0.001 level.

Table 5. Genotypic variances (mean squares) and their interactions for the traits pollen amount (cells/mL) and viable pollen number (cells/mL) across the environments of Gross-Gerau and Rauschholzhausen.

Items	d.f.	Pollen Amount (Cells/mL)	Viable Pollen (Cells/mL)
Genotype	30	57 mio ***	24 mio ***
Environment (Env)	1	82 mio ***	25 mio ***
Genotype × Environment	27	31 mio ***	9.4 mio ***
Error	144	7.8 mio	3.6 mio
Heritability (H^2)		0.41	0.6
Lines	9	22 mio ***	19 mio ***
Environment (Env)	1	96 mio ***	23 mio **
Genotype × Environment	9	14 mio **	9.5 mio ***
Error	45	4.5 mio	2.5 mio
Heritability (H^2)		0.31	0.47
Males	6	25 mio **	26 mio ***
Environment	1	49 mio **	21 mio *
Males × Env	6	8.9 mio	10 mio *
Error	30	5.8 mio	3.2 mio
Females	2	10 mio *	7.6 mio **
Environment	1	55 mio ***	2.7 mio
Females × Env	2	36 mio ***	8.7 mio **
Error	15	2 mio	1 mio
F vs. M	1	6.7 m	0.3 m
Hybrids	20	70 mio ***	27 mio ***
Environment (Env)	1	836 mio ***	6.7 mio
Genotype × Env	17	37 mio ***	9.1 mio **
GCA (F)	2	350 mio ***	176 mio ***
GCA (M)	6	49 mio ***	10 mio *
Ratio GCA F: M		7.1	17.2
Environment (Env)	1	845 mio *	6.5 mio
SCA (F *M)	12	46 mio ***	11 mio **
GCA (F) *Env	2	176 mio ***	27 mio **
GCA (M) *Env	6	22 mio *	6 mio
SCA × Env	10	19 mio *	5 mio
Error	99	9.3 mio	4 mio
Heritability (H^2)		0.41	0.6
L vs. H	1	125 mio *	17 mio

* Significant at 0.05 level; ** Significant at 0.01 level; *** Significant at 0.001 level.

3.4. Heterosis

Under field environments, hybrids as a group performed significantly better for seed set traits than lines in average (as shown by the significant line vs. hybrid effects in Table 3), indicating significant midparent-heterosis (MPH). However, the magnitude of MPH differed strongly among the environments and was much higher under stress conditions (Table 6, Table S2). Looking at the most important trait PHI in detail, an increase in stress intensity implied a higher degree of MPH, ranging from 18.3% MPH in Poel 2017 over 27.2% in Texcoco to 43.4% in Asendorf (the environment with the lowest PHI in average). Selecting the two most tolerant and the two most susceptible females and males (based on their PHI *per se* across all stress environments) and looking at the average MPH of their hybrids, susceptible × susceptible combinations showed by far the highest MPH (205.3%), followed by combinations of 'tolerant female × susceptible male (125.0%), while MPH expressed in combinations of susceptible female × tolerant male (37.4%) and 'tolerant × tolerant (31.9%) was similar to the average MPH of all factorial hybrids (31.4%).

Table 6. Heterosis, GCA prediction accuracy and Pearson's correlation (r) between line *per se* and hybrid performance for the field trials (stress environments: Asendorf 2017, Poel 2017 and Texcoco 2017; control environments: Gross-Gerau 2018, Poel 2018, San Juan del Río 2017).

Items	n	All Environments			Stress Environments			Control Environments		
		Seed Yield Per Panicle	Seed Number	PHI	Seed Yield Per Panicle	Seed Number	PHI	Seed Yield Per Panicle	Seed Number	PHI
[%] of Hybrids with Sign. HPH	47	37.5	35.4	0	18.3	14.3	4.1	18.3	6.1	0
Average MPH [%] (all MPV-Hybrid Comparison)	47	79.0 ***	55.7 ***	10.9 ***	123.3 ***	77.0 ***	31.4 ***	50.4 ***	32.2 ***	3.9 ***
GCA Prediction Accuracy (r^2)	47	0.71 ***	0.70 ***	0.73 ***	0.85 ***	0.86 ***	0.86 ***	0.75 **	0.74 ***	0.8 ***
Correlation (r) <i>per se</i> M: GCA M	7	0.57	0.36	0.66	0.83 *	0.69	0.73	0.14	−0.3	0.35
Correlation (r) <i>per se</i> F: GCA F	7	0.67	0.71	0.6	0.27	0.54	0.24	0.87 **	0.89 **	0.035
Correlation (r) MPV: Hybrid Performance	47	0.52 ***	0.47 ***	0.49 ***	0.65 ***	0.61 ***	0.45 **	0.50 ***	0.51 ***	0.075

* Significant at 0.05 level; ** Significant at 0.01 level; *** Significant at 0.001 level.

In contrast, MPH for PHI was weak, but still significant for the control environments of Gross-Gerau and Poel 2018 (4.9% and 6.5%, respectively), while, in San Juan del Río, there were even no differences between lines and hybrids (Table S2). High-parent heterosis (HPH) for PHI was observed in only a few cases and limited to the stress-environments. For the traits, seed yield per panicle and seed number, higher levels of MPH were observed, and also HPH occurred more frequently. All the same, the expression of heterosis was stronger in the stress environments (Table 6).

Under field environments, hybrids as a group performed significantly better for seed set traits than lines in average (as shown by the significant line vs. hybrid effects in Table 3), indicating significant midparent-heterosis (MPH). However, the magnitude of MPH differed strongly among the environments and was much higher under stress conditions (Table 6, Table S2). Looking at the most important trait PHI in detail, an increase in stress intensity implied a higher degree of MPH, ranging from 18.3% MPH in Poel 2017 over 27.2% in Texcoco to 43.4% in Asendorf (the environment with the lowest PHI in average). Selecting the two most tolerant and the two most susceptible females and males (based on their PHI *per se* across all stress environments) and looking at the average MPH of their hybrids, susceptible $\times$ susceptible combinations showed by far the highest MPH (205.3%), followed by combinations of tolerant female $\times$ susceptible male (125.0%), while MPH expressed in combinations of susceptible female $\times$ tolerant male (37.4%) and 'tolerant $\times$ tolerant (31.9%) was similar to the average MPH of all factorial hybrids (31.4%).

In contrast, MPH for PHI was weak, but still significant for the control environments of Gross-Gerau and Poel 2018 (4.9% and 6.5%, respectively), while, in San Juan del Río, there were even no differences between lines and hybrids (Table S2). High-parent heterosis (HPH) for PHI was observed in only a few cases and limited to the stress-environments. For the traits, seed yield per panicle and seed number, higher levels of MPH were observed, and also HPH occurred more frequently. All the same, the expression of heterosis was stronger in the stress environments (Table 6).

Analyzing the pollen traits under field conditions, the expression of MPH differed from case to case (Table S4). For pollen amount, significant ($\alpha = 0.05$) line vs. hybrids effects were observed for the mean of both environments and for Rauischholzhausen solely, but not for Gross-Gerau. In contrast, for the viable pollen number, the result was vice versa, with significant MPH at Gross-Gerau but not at Rauischholzhausen. HPH for pollen traits under field conditions only occurred exceptionally (Table S4).

For the climate chamber experiments, significant ($\alpha = 0.05$) MPH was only observed for viable pollen under stress conditions. Surprisingly and in contrast to field experiments, PHI showed no significant difference in line vs. hybrid performance.

3.5. Combining Ability for Seed Set Traits

Under both stress and control field environments, all seed set traits of the factorial F_1 -hybrids were strongly influenced by general combining ability (GCA) effects (Table 3). In most cases, the female impact was stronger than the male impact, with the magnitude of female predominance being higher for the group of control environments. Only for seed yield per panicle in stress environments were male GCA effects prevalent. GCA $\times$ environment interaction was significant in most cases, but much lower than variance explained by GCA. Effects of specific combining ability (SCA) were much weaker than GCA effects, but still highly significant, with the relative importance of SCA being higher for the group of control environments. However, SCA $\times$ environment interaction was comparatively strong. Altogether, GCA prediction accuracy for seed set traits was high, especially for the stress environments (0.85–0.86), but still satisfying also for the control environments (0.74–0.80) (Table 6).

3.6. Combining Ability for Pollen Traits

Pollen traits of the F_1 -hybrids measured via IFC in the field environments of Gross-Gerau and Rauischholzhausen were strongly influenced by female GCA effects as well (Table 5), and the predominance of female over male GCA effects (seven-fold for pollen amount and 17-fold for viable

pollen) was even higher than for seed traits. The extent of GCA (F) $\times$ environment interaction was much higher for pollen amount than for viable pollen. SCA effects were significant and, in their magnitude, comparable with male GCA effects. As could be expected, the GCA prediction accuracy (approx. 0.75 for both pollen amount and pollen number, Table S4) was also satisfying for pollen traits.

3.7. Relationship between *Line per se* and Hybrid Performance

The results regarding the correlation between mid-parent value (MPV) and hybrid performance, as well as between line *per se* performance and GCA, diverged among the different environments. The correlation between MPV and hybrid performance for seed set traits was higher for the group of stress environments (Table 6), especially for PHI, where no correlation was observed under control environments. The relationship between *per se* and GCA is more difficult to summarize. For the group stress environments, the correlation was much higher for the males, particularly for seed yield per panicle ($r = 0.83^*$). In contrast, for the group control environments, female *per se* and GCA were highly correlated for seed yield per panicle ($r = 0.87^{**}$) and seed number ($r = 0.89^{**}$), while no relationship was observed on the male side. Looking at the trait PHI, no significant correlation between *per se* and GCA was found across the environments. However, a high correlation ($r = 0.78^*$) between female *per se* and GCA was observed for the most stress-intense environment of Asendorf (Table S2).

Regarding the pollen traits scored under field conditions, a significant correlation between MPV and hybrid performance was only observed for viable pollen at Rauischholzhausen ($r = 0.47^*$). Interestingly, this trait also showed a high correlation between female *per se* and GCA ($r = 0.82$, Table S4).

3.8. Correlations between the Different Experiments

Pearson's correlations among the measured seed set traits and groups of field environments are shown in Figure 4, separately for lines and hybrids to avoid overestimations due to heterosis.

In most cases, there was a medium to high correlation between both environmental groups (stress and control environments) for the particular traits, with higher correlations observed for hybrids than for lines. Furthermore, the different seed set traits were highly correlated with each other within the groups as was to be expected. Looking at the locations in detail, correlations among the different stress environments (Asendorf, Texcoco, Poel 2017) were generally high, whereas correlations among the single control environments (Gross-Gerau, San Juan del Río, Poel 2018) were lower and less consistent (Figure S1). This finding coincides with the relatively higher amount of genotype $\times$ environment interaction observed for the group of control environments. Regarding the correlation for PHI between field and climate chamber experiments, a high and significant correlation was observed ($r = 0.87^{***}$) between field stress environments and climate chamber stress treatment, and only a weak and insignificant ($r = 0.13$) for the controls. Furthermore, a significant and medium high correlation ($r = 0.58^*$) was also found between viable pollen under the climate chamber stress treatment and PHI under field stress environments (Table S7).

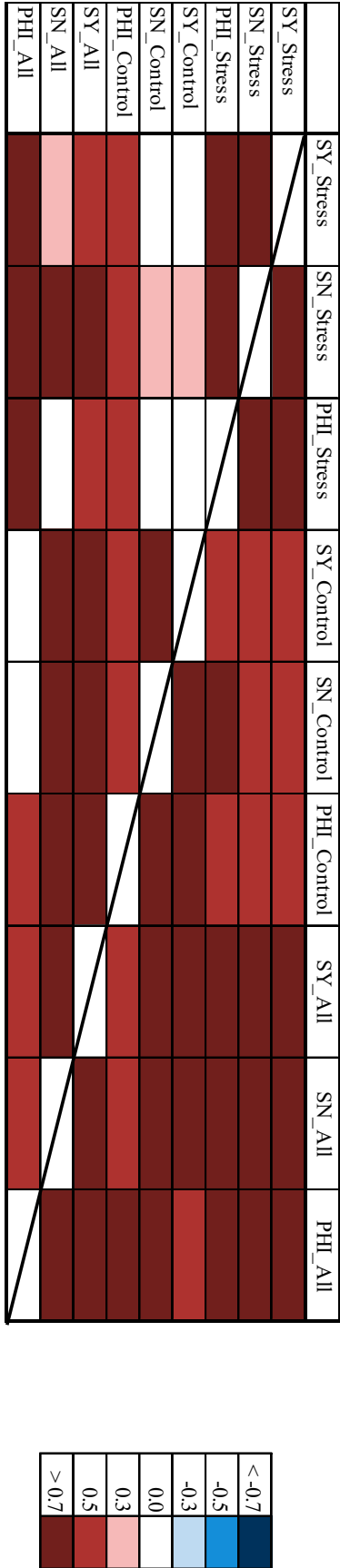


Figure 4. Heat map showing Pearson's correlation for the measured traits for lines (below the diagonal) and hybrids (above the diagonal). SY = Seed yield per panicle; SN = seed number; PHI = panicle harvest index.

4. Discussion

4.1. Heterosis for Reproductive Cold Tolerance

The results of this study show the heterotic character of reproductive cold tolerance in sorghum using a broad data set spanning seed set traits of covered panicles to avoid distortions by cross pollination and including the use of impedance flow cytometry for analysis of pollen traits. To our knowledge, it is only the second study tackling this topic (after [12]), limiting comparison of results. However, heterosis for reproductive cold tolerance has been shown for the related crop rice as well [25], suggesting the same response also for sorghum. A profound dissection of genetic causes underlying heterosis for abiotic stress tolerance is beyond the scope of this study. However, the higher levels of mid-parent heterosis observed in hybrids with susceptible parents than in tolerant $\times$ tolerant combinations coincide with dominance theory. Nevertheless, overdominance theory, stating that heterozygosity is generally advantageous, allowing for a better adaptability to different environments and a more efficient protein metabolism [26], can still play a role and explain the few cases of high-parent heterosis. Since hybrids generally have bigger organs compared to lines [27,28], it could be speculated that this may also apply for anther size, facilitating more pollen production.

Our results confirm the findings of León-Velasco et al. [12] regarding a general heterosis for seed yield under cold stress. However, the level of mid parent-heterosis (MPH) for seed yield (47% and 29%, depending on the set of hybrids) reported in their study was much lower than the magnitude of MPH observed in our stress environments (123.3% in average). Besides differences in experimental set-up (they measured open-pollinated panicles), these divergent levels may be explained by the different background of parental lines. While the authors in [12] utilized only lines adapted to the cold Mexican highlands, our study covered the diversity for cold tolerance in the parental lines, and the inclusion of susceptible lines facilitated a higher expression of MPH due to dominance effects. The higher MPH observed in cold stress environments than in control environments (MPH of 123.3% vs. 50.4% for seed yield and 77.0% vs. 32.2% for seed number) results from the coaction of two heterotic traits, (i) spikelet fertility and (ii) higher number of spikelets. MPH for spikelet fertility, which is most accurately described by the trait PHI, was low in control environments (3.9%), while it reached 31.4% in the group 'stress environments' in average. Hence, heterosis for seed yield and seed number in control environments relied principally on bigger panicles (Figure 5) with a higher number of florets, while, under cold stress, spikelet fertility enhanced the heterotic potential of panicle size. Physiologically, the better spikelet fertility (PHI) of hybrids can be explained by heterosis for viable pollen number, as shown in the climate chamber stress treatment via impedance flow cytometry (IFC). Even though the receptivity of the pistil can also suffer from severe cold stress [13], there is consensus that a high amount of viable pollen guarantees high seed set in sorghum [11] and rice [17].

However, from a breeder's point of view, hybrid performance as sum of mid-parent value and heterosis is decisive and high-parent heterosis (HPH) of more interest than MPH. In contrast to MPH, HPH was less commonly expressed in our study, and for seed yield, the percentage of hybrids expressing significant HPH was the same for stress and control environments (18.3%). Probably, expression of HPH under cold stress was limited by too strong differences between the respective parents, and, in general, a lower performance of the females (Table 3).

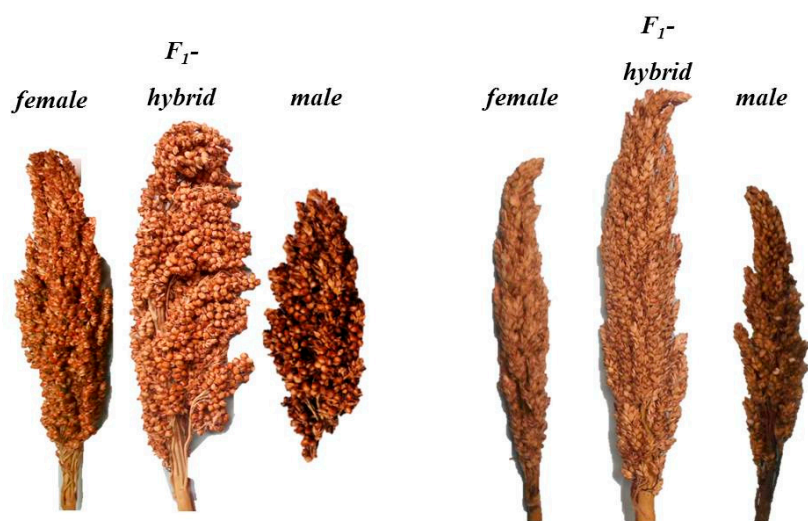


Figure 5. Panicles before threshing from the environment of Texcoco, showing a cold tolerant (left) and a cold sensitive hybrid (right) and their respective parental lines.

4.2. Combining Ability for Reproductive Cold Tolerance

Both seed set and pollen traits were predominantly influenced by female general combining ability (GCA) effects, while male GCA and specific combining ability (SCA) effects played only a minor role. Prevalence of female impacts in F_1 -hybrids were higher for spikelet fertility (PHI) than seed yield traits, suggesting female determination of pollen fertility regardless temperature conditions, while the seed yield potential (spikelet number) is also influenced by the male parent. The 17-fold higher female GCA effect on viable pollen number observed in this study (Table 5) clearly confirms this assumption.

Unfortunately, the literature on combining ability for spikelet or pollen fertility is very limited. While Dane et al. [29] found pollen fertility in tomato hybrids under heat stress to be mainly determined by GCA effects, a strong influence of SCA effects on pollen and spikelet fertility in rice hybrids was reported in some studies (e. g. [30]), contrasting the results of our experiments. However, the GCA/SCA ratio is also known to depend on the genetic diversity of the parental lines, with a high genetic distance between the female and male group enhancing GCA effects [31], and Ram et al. [32] described also the predominance of GCA effects for reproductive cold tolerance in rice.

4.3. General Mode of Inheritance for Reproductive Cold Tolerance

All in all, our results point at a rather dominant inheritance of reproductive cold tolerance in sorghum hybrids. This finding is supported by the observed mid-parent heterosis for PHI and viable pollen number under cold stress, with comparatively higher levels of MPH in crosses including susceptible parents, and the only medium correlation between mid-parent value and hybrid performance. In addition, Singh [1] reported reproductive cold tolerance as a dominant trait but admitted a wide range of variation of cold tolerance in the offspring of a susceptible $\times$ tolerant cross. On the other hand, the strong predominance of GCA over SCA also indicates some additive gene action in our material. However, as previously outlined, this might mainly reflect a high genetic distance between the female and male pool [31] and cannot be generalized in consequence.

4.4. Implications for Hybrid Breeding on Reproductive Cold Tolerance

The strong prevalence of GCA effects on reproductive cold tolerance in sorghum hybrids is good news for breeders, since it facilitates the identification of suitable parents and reduces the amount of necessary crosses to identify hybrids with superior tolerance [31]. Further positive aspects include the environmental stability of GCA (as shown by the comparatively low GCA $\times$ environment interaction,

Table 3) and the high heritability estimates ($H^2 > 0.85$ for hybrids), altogether suggesting the feasibility of a robust breeding progress.

The predominance of female impacts obviously suggests giving priority to enhancements of the female pool. Unfortunately, the development of new female lines tends to be neglected in sorghum breeding, since the backcrossing of new material with maintainer-reaction into existing sterile seed parent lines is time-consuming and of uncertain outcome, due to frequently occurring issues regarding CMS-stability [33]. Hence, the variation in breeding programs is usually much higher among the restorers [34], and many of the currently used females trace back to US *kafir* germplasm [34] with limited general cold tolerance [35]. In addition, in our study, the level of tolerance observed among the females was inferior to the males. Sources of reproductive cold tolerance can be mainly found in tropical highland accessions [1], but obviously these landraces would need conversion to photo insensitivity and improvements in important agronomic traits before using them as hybrid parents in temperate breeding programs. The results regarding correlation between female *per se* and GCA were not concordant over the environments in our study, so that we cannot provide a clear recommendation on how strict breeders should select for *per se* performance prior to conducting GCA tests. However, when evaluating new maintainer lines, practical breeders will need to pre-select anyway based on *per se* before initiating backcrossing and conducting first GCA tests several cycles (years) afterwards. Supporting the efficiency of this procedure, Mendoza-Onofre [9] reported a high correlation ($r = 0.68^{**}$) between female *per se* and GCA for grain yield under cold.

In spite of the higher female impact observed in this study, the restorer pool should not be completely disregarded, since expression of the desirable high-parent heterosis seems only possible when the differences in stress tolerance between the parentals are not too extreme. Moreover, the yield potential of sorghum hybrids is not only determined by the female-influenced spikelet fertility, but also by spikelet number. For seed yield as the most important trait agronomically, the male impact under stress was even slightly higher (Table 3), and the high correlation between male *per se* and GCA ($r = 0.83^*$, Table 6) facilitates selection for suitable restorers.

4.5. Suitable Screening Methods for Reproductive Cold Tolerance

Regarding screening methods, the PHI is the most suitable and reliable trait for the observation of reproductive cold tolerance in sorghum [14], providing the best approximation for spikelet fertility [36,37] by reducing the effect of different spikelet numbers. While spikelet fertility is the crucial trait when evaluating lines seeking for tolerance sources, for hybrid evaluation, the seed yield also obviously needs to be measured, since the PHI indicates pollen fertility, but not the yield potential which is also determined by spikelet number. For a proper evaluation of cold tolerance in a nursery or trial, where lots of genotypes with different tolerance levels and flowering times are grown, the covering of panicles before anthesis is mandatory to avoid overestimations by cross pollination. Impedance flow cytometry (IFC) facilitates the analysis of pollen traits, allowing for a better understanding of the physiological backgrounds. In this regard, an improved knowledge about the most sensitive growth stage would be beneficial for an adequate timing of the stress treatments. As for all studies on abiotic stress tolerance, the choice of adequate selection environments is essential. Under Central European conditions, a sequence of cold nights during the critical pre-flowering stages can induce severe yield losses on sensitive genotypes. However, usually these stress conditions do not occur there steadily, and are preceded and followed by intervals of warmer weather, which complicates the comparability of tolerance levels among genotypes with different flowering times. Hence, tropical highland areas with more constant night temperatures are interesting selection environments, which, in contrast to climate chamber experiments, allow for screening of a high number of genotypes under natural conditions. One important aspect to be taken into account is that there is no clear temperature threshold for pollen sterility induction. Brooking [38] observed a linear decrease of pollen fertility from 14 to 5 °C, describing pollen sterility induction as a quantitative response and not a qualitative one occurring below a specific temperature threshold. Downes and Marshall [8] used 13 °C night

temperature in their phytotron experiment, while, for our material, 7 °C night temperature in climate chamber experiments provided a satisfying variation. In our field experiments, an average night temperature of approx. 13 °C during the critical phase as in the environment of Asendorf was sufficient to induce severe stress reactions on the same material, underlining the well-known problems in the comparison of field and controlled climate chamber experiments, since problems in the seed set can also be enhanced by other factors under natural conditions. Among our field environments, Texcoco in the Mexican highlands had the lowest minimum temperatures (Figure 1). Nevertheless, PHI was lowest in average in Asendorf, showing that other factors than only minimum temperatures play a role. For the maritime high-latitude environments of Asendorf and Poel 2017, lack of radiation and suboptimal daily temperatures of frequently < 20 °C induced constant stress conditions, while radiation was not limiting in the tropical highland environment of Texcoco, and the daily temperatures were also higher there. However, in spite of these climatic differences, the genotype × environment interaction observed among the stress environments in our study was surprisingly low, and the high heritability estimates suggest good prospects for breeding of hybrids with stable reproductive cold stress tolerance.

5. Conclusions

Enhancements in reproductive cold tolerance are essential for a successful adaption of sorghum into both tropical highland areas and temperate climates. Our study indicates a heterotic and rather dominant inheritance of this complex trait. Along with the strong GCA effects and high heritability estimates, this finding suggests that efficient hybrid breeding can enable a robust breeding progress.

Supplementary Materials: The following are available online at <http://www.mdpi.com/2073-4395/9/9/508/s1>. Table S1. Genotypic variances (mean squares) of the measured traits separately for each field environment. Table S2. Heterosis, GCA prediction accuracy and Pearson's correlation between line *per se* and hybrid performance separately for each field environment. Table S3. Genotypic variances (mean squares) for the traits pollen amount (cells/mL) and viable pollen number (cells/mL), separately for the environments of Gross-Gerau and Rauischholzhausen. Table S4. GCA prediction accuracy and Pearson's correlation (r) between line *per se* and hybrid performance for pollen amount and viable pollen number for the field experiments of Gross-Gerau and Rauischholzhausen. Table S5. Descriptive statistical data for the field experiments. Table S6. Descriptive statistical data for the climate chamber experiments, and the scored pollen traits in the field experiments of Gross-Gerau and Rauischholzhausen. Table S7. Correlation between the field trials and the climate chamber experiments. Figure S1. Heat map showing Pearson's correlation for the reported traits for lines (below the diagonal) and hybrids (above the diagonal). SY = seed yield per panicle (g); SN = grain number; PHI = panicle harvest index; AS = Asendorf; PO = Poel; SJR = San Juan del Rio (MX); TEX = Texcoco (MX); GG = Gross Gerau.

Author Contributions: A.S. and S.W. contributed equally to this manuscript and are both listed as first authors in consequence. Devised the study, B.W. and S.W. received the funding, B.W. and R.S.; planned and oversaw the field trials and climate chamber experiments, and conducted the data analysis, A.S.; interpreted the results and wrote the manuscript, A.S. and S.W.

Acknowledgments: For excellent trial management, we thank: Norddeutsche Pflanzenzucht Hans-Georg Lembke KG (NPZ) in general and Bärbel Frenz in particular for trials at Poel, Deutsche Saatveredelung (DSV) in general and Dörte Schweneker in particular for trials at Asendorf; Karlheinz Balzer and field team for trials at Rauischholzhausen, Mario Tolksdorf and field team for trials at Gross-Gerau and Manuel Velazquez Almaraz for the field trials in Mexico. For competent technical assistance during the climate chamber trials, we thank Birgit Keiner, Sabine Frei, Annette Plank, Svetlana Renner and Nelly Weis. We also thank Amphasys® AG for excellent support during pollen analyses. This research was funded by FNR (Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e. V., Germany) grants 22008716 and 22023515.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Singh, S.P. Sources of cold tolerance in grain sorghum. *Can. J. Plant Sci.* **1985**, *65*, 251–257. [[CrossRef](#)]
2. Maulana, F.; Weerasooriya, D.; Tesso, T. Sorghum landrace collections from cooler regions of the world exhibit magnificent genetic differentiation and early season cold tolerance. *Front. Plant Sci.* **2017**, *8*, 756. [[CrossRef](#)]

3. Brooking, I. Male Sterility in *Sorghum bicolor* (L.) Moench Induced by Low Night Temperature. I. Timing of the Stage of Sensitivity. *Funct. Plant Boil.* **1976**, *3*, 589. [\[CrossRef\]](#)
4. Bekele, W.A.; Fiedler, K.; Shiringani, A.; Schnaubelt, D.; Windpassinger, S.; Uptmoor, R.; Friedt, W.; Snowdon, R.J. Unravelling the genetic complexity of sorghum seedling development under low-temperature conditions. *Plant. Cell Environ.* **2014**, *37*, 707–723. [\[CrossRef\]](#)
5. Yu, J.; Tuinstra, M.R. Genetic Analysis of Seedling Growth under Cold Temperature Stress in Grain Sorghum. *Crop. Sci.* **2001**, *41*, 1438. [\[CrossRef\]](#)
6. Windpassinger, S.; Friedt, W.; Deppé, I.; Werner, C.; Snowdon, R.; Wittkop, B. Towards Enhancement of Early-Stage Chilling Tolerance and Root Development in Sorghum F1 Hybrids. *J. Agron. Crop. Sci.* **2017**, *203*, 146–160. [\[CrossRef\]](#)
7. Windpassinger, S.; Friedt, W.; Frauen, M.; Snowdon, R.; Wittkop, B. Designing adapted sorghum silage types with an enhanced energy density for biogas generation in temperate Europe. *Biomass-Bioenerg.* **2015**, *81*, 496–504. [\[CrossRef\]](#)
8. Downes, R.; Marshall, D. Low temperature induced male sterility in *Sorghum bicolor*. *Aust. J. Exp. Agric.* **1971**, *11*, 352–356. [\[CrossRef\]](#)
9. Mendoza-Onofre, L.E. Formación de híbridos de sorgo para grano. II. Comportamiento *per se* de las líneas y su aptitud combinatoria general. *Revis. Fitotec. Mex.* **1988**, *11*, 39–47.
10. Osuna-Ortega, J.; Mendoza-Onofre, L.E.; González-Hernández, V.A.; Castillo-González, F.; Mendoza-Castillo, M.; Williams-Alanís, H. Potential of cold tolerant germplasm in the adaptation and adaptability of sorghum in México: I. High Valleys. *Agrociencia* **2000**, *34*, 561–572.
11. Osuna-Ortega, J.; Mendoza-Castillo, M.D.C.; Mendoza-Onofre, L. Sorghum cold tolerance, pollen production, and seed yield in the central high valleys of Mexico. *Maydica* **2003**, *48*, 125–132.
12. León-Velasco, H.; Mendoza-Onofre, L.E.; Castillo-González, F.; Cervantes-Santana, T.; Martínez-Garza, Á. Evaluación de dos generaciones de híbridos y progenitores de sorgo tolerantes al frío. II: Aptitude combinatoria, heterosis y heterobeltiosis. *Agrociencia* **2009**, *43*, 609–623.
13. Cisneros-López, M.E.; Mendoza-Onofre, L.E.; Zavaleta-Mancera, H.A.; González-Hernández, V.A.; Mora-Aguilera, G.; Córdova-Téllez, L.; Hernández-Martínez, M. Pollen–pistil interaction, pistil histology and seed production in A × B grain sorghum crosses under chilling field temperatures. *J. Agric. Sci.* **2010**, *148*, 73–82. [\[CrossRef\]](#)
14. Krishnamurthy, L.; Dinakaran, E.; Kumar, A.A.; Reddy, B.V.S. Field Technique and Traits to Assess Reproductive Stage Cold Tolerance in Sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench). *Plant. Prod. Sci.* **2014**, *17*, 218–227. [\[CrossRef\]](#)
15. Srinivasan, A.; Saxena, N.P.; Johansen, C. Cold tolerance during early reproductive growth of chickpea (*Cicer arietinum* L.): Genetic variation in gamete development and function. *Field Crops Res.* **1999**, *60*, 209–222. [\[CrossRef\]](#)
16. Shinada, H.; Iwata, N.; Sato, T.; Fujino, K. Genetical and morphological characterization of cold tolerance at fertilization stage in rice. *Breed. Sci.* **2013**, *63*, 197–204. [\[CrossRef\]](#)
17. Mitchell, J.H.; Zulkafli, S.L.; Bosse, J.; Campbell, B.; Snell, P.; Mace, E.S.; Godwin, I.D.; Fukai, S. Rice-cold tolerance across reproductive stages. *Crop. Pasture Sci.* **2016**, *67*, 823–833. [\[CrossRef\]](#)
18. Heidmann, I.; Schade-Kampmann, G.; Lambalk, J.; Ottiger, M.; Di Berardino, M. Impedance flow cytometry: A novel technique in pollen analysis. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0165531. [\[CrossRef\]](#)
19. Stephens, J.C.; Holland, R.F. Cytoplasmic Male-Sterility for Hybrid Sorghum Seed Production1. *Agron. J.* **1954**, *46*, 20–23. [\[CrossRef\]](#)
20. Kirby, J.S.; Atkins, R.E. Heterotic Response for Vegetative and Mature Plant Characters in Grain Sorghum, *Sorghum bicolor* (L.) Moench1. *Crop. Sci.* **1968**, *8*, 335–339. [\[CrossRef\]](#)
21. Pinthus, M.J.; Rosenblum, J. Germination and Seedling Emergence of Sorghum at Low Temperatures. *Crop. Sci.* **1961**, *1*, 293–296. [\[CrossRef\]](#)
22. Piepho, H.-P.; Möhring, J. Computing Heritability and Selection Response from Unbalanced Plant Breeding Trials. *Genetics* **2007**, *177*, 1881–1888. [\[CrossRef\]](#)
23. Hallauer, A.R.; Miranda Fo, J.B. *Quantitative Genetics in Plant Breeding*, 2nd ed.; Iowa State University Press: Ames, IA, USA, 1988.
24. Mühleisen, J.; Maurer, H.P.; Stiewe, G.; Bury, P.; Reif, J.C. Hybrid breeding in barley. *Crop. Sci.* **2013**, *53*, 819–824. [\[CrossRef\]](#)

25. Kaw, R.N.; Khush, G.S. Heterosis in traits related to low temperature tolerance in rice. *Philipp. J. Crop. Sci.* **1985**, *10*, 93–105.
26. Goff, S.A. A unifying theory for general multigenic heterosis: Energy efficiency, protein metabolism, and implications for molecular breeding. *N. Phytol.* **2011**, *189*, 923–937. [[CrossRef](#)]
27. Duvick, D.H. Heterosis: Feeding people and protecting natural resources. In *The Genetics and Exploitation of Heterosis in Crops*; Coors, J.G., Pandey, S., Eds.; American Society of Agronomy, Inc.; Crop Science Society of America, Inc.: Madison, WI, USA, 1999; pp. 19–29.
28. Flint-Garcia, S.A.; Buckler, E.S.; Tiffin, P.; Ersoz, E.; Springer, N.M. Heterosis is prevalent for multiple traits in diverse maize germplasm. *PLoS ONE* **2009**, *4*, e7433. [[CrossRef](#)]
29. Dane, F.; Hunter, A.G.; Chambliss, O.L. Fruit Set, Pollen Fertility, and Combining Ability of Selected Tomato Genotypes under High-temperature Field Conditions. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* **1991**, *116*, 906–910. [[CrossRef](#)]
30. Singh, S.; Sahu, P.; Sharma, D.; Ojha, G.C. Combining ability analysis to identify suitable parents for heterotic rice hybrid breeding. *Ecoscan* **2015**, *7*, 361–369.
31. Reif, J.C.; Hallauer, A.R.; Melchinger, A.E. Heterosis and heterotic pattern in maize. *Maydica* **2005**, *50*, 215–223.
32. Ram, N.K.; Moon, H.P.; Yae, J.D.; Visperas, R.M. Estimates of combining ability for cold tolerance at reproductive stage in rice. *Korean J. Breed.* **1989**, *21*, 188–195.
33. Jordan, D.R.; Klein, R.R.; Sakreuski, K.G.; Henzell, R.G.; Klein, P.E.; Mace, E.S. Mapping and characterization of Rf 5: A new gene conditioning pollen fertility restoration in A1 and A2 cytoplasm in sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench). *Theor. Appl. Genet.* **2011**, *123*, 383–396. [[CrossRef](#)]
34. Menz, M.A.; Unruh, N.C.; Rooney, W.L.; Klein, P.E.; Mullet, J.E.; Klein, R.R. Genetic Diversity of Public Inbreds of Sorghum Determined by Mapped AFLP and SSR Markers. *Crop. Sci.* **2004**, *44*, 1236–1244. [[CrossRef](#)]
35. Marla, S.R.; Burow, G.; Chopra, R.; Hayes, C.; Olatoye, M.; Felderhoff, T.; Hu, Z.; Raymundo, R.; Perumal, R.; Morris, G.P. Genetic architecture of chilling tolerance in sorghum dissected with a nested association mapping population. *bioRxiv* **2019**, 622894. [[CrossRef](#)]
36. Dhopte, A.M.; Eastin, J.D. Response of sorghum to elevated night temperature imposed during floret differentiation under field conditions. In Proceedings of the International Congress of Plant Physiology, New Delhi, India, 15–20 February 1988; Volume 2.
37. Dhopte, A.M.; Eastin, J.D. Influence of night temperature during floret differentiation on microsporogenesis and seedsetting in sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench). *Role Biotechnol. Agric.* **1992**, 193–200.
38. Brooking, I. Male Sterility in *Sorghum bicolor* (L.) Moench Induced by Low Night Temperature. II. Genotypic Differences in Sensitivity. *Funct. Plant Biol.* **1979**, *6*, 14. [[CrossRef](#)]



© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Kapitel 4

Publikation II

‘Sorghum as a Novel Crop for Central Europe: Using a Broad Diversity Set to Dissect Temperate-Adaptation’

André Schaffasz, Steffen Windpassinger, Wolfgang Friedt, Rod Snowdon and Benjamin Wittkop (2019)

Publiziert in:

Agronomy 2019, 9, 535; doi:10.3390/agronomy9090535

Zusammenfassung

Dies ist die erste Publikation, die wichtige agronomische Merkmale hinsichtlich Reife, Wuchshöhe Trockenmassegehalt, Zuckergehalt und diverser Kältetoleranz-Merkmale an einem Sorghum-Diversitäts-Set für unterschiedliche Umwelten in Deutschland beschreibt. Das Diversitäts-Set besteht überwiegend aus Sorghum-Konversionslinien. Die Ergebnisse zeigen, dass einige Linien des Diversitäts-Sets eine hohe Anpassungsfähigkeit an die vorherrschenden Bedingungen in Zentral-Europa aufweisen und somit den Grundstein für ein erfolgreiches Sorghum-Züchtungsprogramm für die hiesigen Regionen legen können.

Article

Sorghum as a Novel Crop for Central Europe: Using a Broad Diversity Set to Dissect Temperate-Adaptation

André Schaffasz [†], Steffen Windpassinger ^{*,†}, Wolfgang Friedt, Rod Snowdon and Benjamin Wittkop

Department of Plant Breeding, Research Center for BioSystems, Land Use and Nutrition (IFZ), Heinrich-Buff-Ring 26–32, 35392 Giessen, Germany; andre.schaffasz@agrar.uni-giessen.de (A.S.); wolfgang.friedt@agrar.uni-giessen.de (W.F.); rod.snowdon@agrar.uni-giessen.de (R.S.); benjamin.wittkop@agrar.uni-giessen.de (B.W.)

* Correspondence: steffen.m.windpassinger@agrar.uni-giessen.de; Tel.: +49-(0)641-99-37443;

Fax: +49-(0)641-99-37429

† These authors contributed equally to this work.

Received: 18 July 2019; Accepted: 4 September 2019; Published: 11 September 2019



Abstract: Sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench) is a promising novel crop for Central Europe. However, enhancements in cold tolerance and early maturity are essential for a successful adaptation to cooler climates. We scored a broad sorghum diversity set ($n = 338$) for early chilling tolerance, high-latitude adaptation, and bioenergy related agronomical traits in multi-environment trials. Our results show a high phenotypic variation and medium to high heritabilities for most traits, indicating that a robust breeding progress is feasible. Several public accessions with a good adaptation to cooler climates were identified, which can serve as valuable base material for sorghum breeding in temperate areas. Genome-wide association studies reveal a polygenic (quantitative) character for most of the traits, confirming previous studies. Hence, for practical breeding, it will be difficult to conduct efficient marker-assisted selection for temperate-adaptation traits in genetically diverse material.

Keywords: sorghum breeding; cold tolerance; temperate-adaptation; sorghum germplasm resources; GWAS; bioenergy crops

1. Introduction

Sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench, $2n = 20$) is one of the most important cereals of the world, ranking fifth in terms of global production. It is important as a stress-tolerant staple crop in Africa and India, and represents an important commodity for feed, export, and bioenergy in countries like the USA, Mexico, Argentina, and Australia. The availability of its complete genome sequence [1] holds the potential for a more efficient exploitation of its huge genetic diversity [2–4] to accelerate breeding progress and yield gains, which have substantially lagged behind other crops during the last decades [5].

In the context of climate change, the resilient and versatile sorghum [6] is expected to be of increasing importance also in temperate areas such as Central Europe. It may be a valuable alternative to maize as a biogas and fodder crop, owing to its higher drought tolerance, nutrient efficiency, and *Diabrotica* resistance. Breeding progress in chilling tolerance and early maturity is essential to make it competitive for farmers [7,8]. Being an originally tropical C_4 plant, the sensitivity of sorghum to temperatures below 15 °C [9] substantially delays the sowing time on the expense of growth period and yield potential. Chilling stress has detrimental effects on nearly all physiological and developmental processes in juvenile sorghum plants, affecting both heterotrophic (emergence) and autotrophic growth (photosynthesis and root development) [10,11]. Fortunately, a broad variation for chilling tolerance

among different germplasms has been observed [12–14], with tolerant accessions originating, for example, from China or tropical highlands. Although, selection for chilling tolerance among breeding lines is complicated because of unpredictable weather from year to year, resulting in too harsh or too mild conditions for a proper selection, as well as unstable correlations between controlled environment and field conditions [11,15].

Several studies have aimed at the identification of quantitative trait loci (QTL) for a better understanding of the physiological mechanisms behind chilling tolerance related traits, either in bi-parental populations [10,16,17] or diversity sets: 194 biomass lines from KWS company (Einbeck, Germany) [7,18–20]; 242 accessions of the ICRISAT (International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics) sorghum mini core collection [21]; 136 sorghum accessions from cooler regions of the world [14]; and 300 sorghum accessions from the U.S. sorghum association panel [22]. Genomic regions influencing traits of interest have been concordantly confirmed in these studies.

Besides chilling tolerance, early flowering is a crucial trait for adaptation into higher latitudes, allowing for enough time to reach an adequate maturity before the first frosts in fall. Photoperiodism of sorghum is controlled by four major maturity loci, designated Ma_1 , Ma_2 , Ma_3 , and Ma_4 , where dominant alleles cause late flowering [23,24]. More recently, two additional, epistatic maturity genes were described (Ma_5 and Ma_6 [25]). Out of these loci, Ma_1 (cloned by the authors of [26]) has the largest impact [27], and a recessive mutation at this locus alone, which occurred independently in different parts of the world, is sufficient to confer some temperate-adaptedness [28]. However, among genotypes with the same configuration of Ma -alleles, flowering time is considered largely additive, with a small degree of dominance for early flowering observed in hybrid combinations [29], and several QTL were detected in studies on nested association mapping (NAM)-populations [30], bi-parental populations [31,32], and a diversity panel [33]. When the intended use of sorghum is whole-plant silage (e.g., for cattle feeding or biogas), it is important that at least 28% dry matter content is reached at harvest time, representing a major challenge in high-latitude environments with a short growing season and low insolation. Hence, the whole-plant dry matter fraction attained by the end of the growing period is a more valuable indicator for maturity than days to flowering, even if a relation between these two traits can be expected. To our best knowledge, no QTL study has aimed at this particular trait yet.

Plant height, in the case of sorghum mainly determined by four unlinked major dwarfing loci (Dw_1 , Dw_2 , Dw_3 , Dw_4) [34] being incompletely dominant for tallness [35], is considered a good predictor for biomass yield [36–38]. Even though this concept has to be relativized with medium-height, early dual-purpose, or silage types, which are the preferable ideotype for biogas generation in Central Europe [8]. Nevertheless, in these dual-purpose types with a higher proportion of grains, stems still account for around 40% of total biomass [8]. Because these ideotype plants should not be too tall, enhancements of the stem as a major yield component can mainly be achieved via selection for its diameter. Zhao et al. [33] found this trait to be highly quantitative with several small-effect QTL. Regarding stem sugar content (expressed as brix), QTL have been detected in several studies on both bi-parental populations [32,36,39–42] and genome-wide diversity panels [38,43]. However, for the particular use of sorghum for biogas generation in temperate environments, juicy stems, going on the expense of dry matter content and yield, do not fit the described ideotype. However, some soluble sugars in a predominantly dry stem contributing to a high digestibility seem to be desirable, as long as no strong sink competition for seed yield is effected, and in a recent study, Shukla et al. showed that a high sugar concentration is not conditional on the plants being tall [44].

In the present study, we composed a broad diversity set ($n = 338$) for extensive phenotyping regarding crucial high-latitude adaptation traits of sorghum, such as early-stage chilling tolerance and juvenile development (under both controlled and field conditions), early maturity (flowering and whole-plant dry matter content), and suitable bioenergy related traits (plant height, stem diameter, and brix). Aiming at a contribution to temperate-adaptation breeding of sorghum, the goals of this study are (1) to assess the extent of variation for these traits in multiple-environment trials in Central

Europe, analyzing genotype $\times$ environment interactions, heritability, and trait correlations; (2) to identify suitable accessions with a good local adaptation for breeding; and (3) to find marker–trait associations by genome-wide association studies (GWAS) and compare them with the results of the aforementioned studies.

This is the first study analyzing both agronomical and cold tolerance traits on a broad, publicly available diversity set under Central European environmental conditions.

2. Materials and Methods

2.1. Germplasm

A *Sorghum bicolor* diversity set comprising 338 lines of different origin, subspecies, and use was utilized for the present study. The original germplasm was mainly received from the United States Department of Agriculture–Agricultural Research Service (USDA-ARS). A representative selection of sorghum conversion lines, obtained in the 1960s by repeated backcrossing of genetically diverse tropical accessions to a short, photoperiod-insensitive cultivar [45], accounts for 65% ($n = 220$) of the set. These conversion lines are short or medium statured and photoperiod-insensitive owing to the selection for recombinants with recessive *dw* and *ma* alleles, but otherwise closely related to their exotic progenitors. Hence, they represent a valuable and widely used base material for sorghum breeding in temperate areas [46,47]. The uniformity of the conversion lines used in this study was improved over four cycles before the start of the experiments. Some lines showed a greater heterogeneity for traits like earliness or plant height from the outset; in these cases, up to three sublines were selected per accession. However, only sublines whose genetic distance (Rogers distance) to each other was higher than the threshold of 6.8% (mean Rogers distance among respective sublines) were included in the diversity set. The remaining part of the diversity set consists of breeding lines for dual-purpose, forage, or sweet sorghum from different parts of the world, including $n = 55$ brown-midrib (*bmr*) lines. These *bmr*-lines are of special interest for biogas or cattle feeding purposes, owing to their reduced lignin content and higher digestibility, provided that their agronomical performance is satisfactory [48]. Considering the origins of the conversion line progenitors, our set contains accessions from a total of 26 countries. Furthermore, 88 lines of this set are also part of the U.S. sorghum diversity panel [49]. The composition of the diversity set, and all phenotypic data collected in this study, are shown in detail in Tables S1–S3, Supplementary material.

To exclude the influence of different production environments on seed traits, all seeds used for chilling stress experiments (both controlled environment and field trials) were taken from one seed lot, which was produced in a winter nursery in Puerto Vallarta, Mexico, under optimal conditions and harvested in April 2013. Further, seeds were treated with MaximXL™ (Syngenta, agent *fludioxonil*) at the label rate to avoid fungal infections distorting the results.

2.2. Phenotyping

Controlled Chilling Stress Experiment

Controlled chilling stress (13 °C day/10 °C night; day/night period set at 14 h/10 h to resemble actual Central European conditions in late spring) was applied on the diversity set in a climate chamber, using the experimental setting of a randomized complete block design (RCBD) with four replications. A total of 32 seeds were sown in approximately 2 cm depth in pots (12 $\times$ 12 $\times$ 12 cm, one pot per replication) filled with sterilized sand. Adequate plant nutrition was provided by applying Murashige & Skoog Basal Salt Mixture™ (Duchefa Biochemie B.V., Haarlem, The Netherlands) as fertilizer (4 $\times$ 100 mL of 0.25 $\times$ MS). The number of emerged seedlings was counted each day, and 28 days after sowing, the final emergence was scored. The emergence index (EI; low values indicate a fast and complete emergence) was calculated as described by Smith and Millet [50] using the following formula:

$$EI = \frac{[\sum (E_j \times D_j)]}{E} \quad (1)$$

where E_j is the number of newly emerged plants on day j , D_j is the days after planting, and E is the final emergence. The experiment was finalized after 28 days. Leaf greenness was visually scored (1 white, complete chlorophyll degradation; 5 medium chlorosis; 9 dark green, no chlorosis), after which the seedlings were harvested and rinsed. The total shoot and root matter of each replication was dried for several days at 70 °C, weighed, and divided by the number of emerged plants to determine shoot (SDW) and root (RDW) dry weight per plant.

2.3. Field Experiments for Chilling Stress and Juvenile Development

To score the variation for emergence and juvenile development under field conditions, experiments were conducted at two sites in Germany during the years 2013 and 2014. Poel (PL), a small island near Wismar in the Baltic Sea, is characterized by a maritime climate with delayed warming in spring and light soils (loamy sand). Giessen (GI), located in the Lahn river valley in Hesse (Germany), has heavy clay soils and higher daily temperature amplitudes (Tables 1 and 2). In 2013, the trials were sown at the recommended ('normal') planting dates for sorghum and chilling stress was only light, while in 2014, sowing was approximately one month earlier, resulting in notably harsher growth conditions. At both sites, a RCBD with two replications was used. Entries were grown in single-row plots (2.5 × 0.5 m) in GI and double-row plots (2.5 × 1.0 m) in PL, with 0.5 m row spacing, 50 seeds per row, and 2 cm sowing-depth at both sites. Fertilizer and herbicide applications were executed following good agronomical practice. Approximately four weeks after sowing, final emergence was counted and 10 representative plants per plot were harvested by hand (around 1 cm above ground) and dried overnight at 105 °C to determine the shoot dry weight per plant (SDW).

Table 1. Climate data of the field trial sites during the duration of the respective experiments for emergence and juvenile development.

Site	Year	Trial Dates (Sowing-Harvest)	Mean Temp. (°C)	Mean Max. Temp. (°C)	Mean Min. Temp. (°C)	Absolute Max. and Min. Temp. (°C)	Mean Soil Temp. (°C)	Min. Soil Temp. (°C)	Precipitations (mm)
Giessen (GI)	2013	5 June–5 July	17.4	23.3	11.5	34.5/5.1	20.5	17.7	44
	2014	6 May–5 June	13.8	19.8	7.8	28.5/2.3	17.3	14.2	68
Poel (PL)	2013	5 June–8 July	16.5	20.7	12.3	31.7/8.3	18.8	15.6	79
	2014	6 May–10 June	15.1	19.4	10.8	30.3/6.7	16.1	10.4	93

Table 2. Geographical data of the different experimental locations.

Site	Coordinates	Altitude	Soil Type	Day Length at Summer Solstice
Poel (PL)	53°99' N, 11°47' E	19 m	Loamy sand	17 h 10 min
Rauischholzhausen (RH)	50°46' N, 8°53' E	270 m	Loam	16 h 31 min
Giessen (GI)	50°35' N, 8°41' E	158 m	Clay	16 h 29 min
Gross-Gerau (GG)	49°55' N, 8°29' E	90 m	Sand	16 h 22 min

2.4. Field Experiments for Maturity and Bioenergy Related Agronomical Traits

Adaptation traits beyond juvenile development were scored in a total of seven environments. At Poel (2013 and 2014), the previously described experiments for juvenile development were continued over the whole vegetation period. Further, the diversity set was planted at the experimental fields of Gross-Gerau (GG; 2012, 2013 and 2014) and Rauischholzhausen (RH; 2013 and 2014) in an unreplicated RCBD with double-row plots (2.5 × 1.5 m, 0.75 m row spacing, and 50 seeds per row at both sites). Geographical and climate data of the locations are shown in Tables 1 and 2, respectively. Gross-Gerau, as the southernmost and warmest location, has the most favorable conditions for sorghum. It is located around 25 km SW of Frankfurt/M. in the Upper Rhine Valley, which enjoys the highest temperatures in Central Europe. In contrast, Rauischholzhausen, located in a low mountain range landscape of Central Hessen, has a rather cool, continentally-influenced climate and provides harsh conditions for sorghum.

Besides its already mentioned maritime climate, Poel is of special interest as the northernmost (54° N) location with the longest day length (17 h 10 min during summer solstice).

In contrast to juvenile development, the agronomical data described below (Table 3) were scored only in one plot. Flowering (days to flowering, DTF; expressed as days from sowing to flowering) was scored when 10% of the plot had commenced anthesis. Brix, which describes the percentage of soluble solids (i.e., sugars) in stalk juice, was measured with a hand-held refractometer (Arcarda, Reichelsheim, Germany; Type REF 111/112/113) on three plants per plot (considered as replicates) by squeezing the fourth node from the ground. The timing for the brix measurements was 40 days after anthesis, because sugar accumulation has been reported to reach its optimum at that stage [37]. Stem diameter (SD) was scored on the same three plants as used for brix around 20 cm above ground. Plant height (PH) was measured at the end of the growing season from the ground to the panicle tip on plot basis. Whole-plant dry matter content (DMC) was assessed at the end of the growing period in the first October decade. For this purpose, approximately 20 plants per entry were cut at 3 cm above ground, weighted, milled, and dried at 105 °C for several days and re-weighted.

Table 3. Overview of the field experiments scoring maturity and agronomical traits. DTF, days to flowering; PH, plant height; DMC, dry matter content; SD, stem diameter.

Site	Year	Traits Scored	Sowing Date	Climate Data from Sowing Until 10 October		
				Mean Max. Temperature (°C)	Mean Min. Temperature (°C)	Precipitations (mm)
Poel (PL)	2013	DTF, PH	5 June	21.0	12.5	195
	2014	DTF, PH	6 May	21.4	13.3	341
Rauischholzhausen (RH)	2013	DTF, PH, DMC	11 June	22.2	9.1	240
	2014	DTF, PH, DMC	21 May	22.6	11.1	424
Gross-Gerau (GG)	2012	DTF, PH, Brix, SD, DMC	29 May	24.3	11.6	338
	2013	DTF, PH, Brix, SD, DMC	4 June	24.4	12.1	275
	2014	DTF, PH, Brix, SD, DMC	20 May	25.0	11.8	330

2.5. Statistical Analysis of Phenotypic Data

An analysis of variance (ANOVA) was performed for each trait using the following general linear model, in which genotypes and environments were considered as fixed and replicates as random effects:

$$Y_{ijk} \sim \mu + G_i + E_j + GE_{ij} + R_{kj} + e, \quad (2)$$

where μ represents the population mean, G_i is the genotypic effect, E_j is the environmental effect, GE_{ij} is the genotype-by-environment interaction, R_{kj} is the replicate effect, and e is the residual effect.

To compare the levels of genotypic variance obtained in the different environments, ANOVA was also computed separately for each environment, using the following general linear model, where genotypes were considered as fixed and replicates as random effects:

$$Y_{ij} \sim \mu + G_i + R_j + e. \quad (3)$$

For the traits DTF, DMC, and PH, which were scored on a plot basis and thus lacked degrees of freedom in one experiment, the years at one specific location were taken as replicates and the locations as environments. For the other traits, one location in one year was considered an environment, and the controlled chilling stress experiment was also seen as a separate environment.

The heritability was calculated as proposed by Piepho & Möhring [51] using the following formula:

$$H^2 = \frac{\sigma_G^2}{\sigma_G^2 + \frac{1}{2}vd}, \quad (4)$$

where h^2 represents broad-sense heritability, σ^2_G is the genotypic variance calculated by a random effect model considering genotype and environment as random factors, and $\overline{vd}$ is the average variance of the difference between two means.

The phenotypic stability of the best performing inbred lines for selected traits was analyzed by the weighted sum of the first and second principal component, using the R package agricolae [52].

2.6. Analysis of Genotypic Data

For all entries of the diversity set ($n = 338$), genomic DNA was isolated from young leaves using the extraction machine BioSprint 96 (Qiagen, Hilden, Germany). Genotyping was conducted with a *Sorghum bicolor* 3K-Illumina single nucleotide polymorphism (SNP) array comprising 2620 SNPs [53]. SNP-positions were converted from *Sorghum bicolor* version 1.4 (as used by the authors of [53]) to the most recent version v3.1.1 using <http://ensembl.gramene.org> and 2593 SNPs left. Data pre-processing and a genome-wide association analysis (GWAS) were performed using the statistical software R studio version 1.0.136 package GenABEL. SNPs with more than 10% missing data and a minor allele frequency <5% were excluded. In addition, all individuals with more than 10% missing data were excluded. After pre-processing, 1507 SNPs and 338 individuals remained. For the GWAS, we used a mixed model combined with principal component adjustment based on the first three principal components [54–56]. All SNPs with a $-\log_{10}(p\text{-value}) > 3$ were considered as significant, and Bonferroni correction was applied to find highly significant SNP-trait association.

Analysis of phylogenetic relatedness was conducted with TASSEL version 4.3 [57] using the neighbor-joining method [58], and Dendroscope 3.5.9 [59] was utilized to visualize the phylogram.

3. Results

3.1. Phenotypic Variation for Chilling Tolerance and Juvenile Development

Highly significant differences among entries were observed for all traits in all environments (Tables 4 and 5). For the field trials, year effects were highly significant owing to the earlier sowings in 2014 compared with 2013. The experiment in GI 2014 had the harshest conditions with temperatures close to freezing on some nights (Table 1), resulting in a seven-fold reduction of SDW as compared with GI 2013. In contrast, at PL, there was no significant difference for SDW between 2014 and 2013, but average emergence was 20% less in 2014. Even though $G \times E$ interactions were also highly significant, their variance was notably lower than the total genotypic variance (Table 6). We observed heritabilities of 0.74 for emergence and 0.41 for SDW. The heritability for SDW is the lowest among the traits scored in the present study and underlines the strong $G \times E$ interaction.

Table 4. Genotypic variances (mean squares, MS) and descriptive statistical traits for the different field experiments scoring chilling tolerance and juvenile development. Genotypic variances were computed using a general linear model in which genotypes were considered as fixed and replicates as random effects (see Materials and Methods).

Experiment	df	Emergence (%)					Shoot Dry Weight (mg) (SDW)				
		MS	Error	Mean	Min	Max	MS	Error	Mean	Min	Max
GI 2013	289	382.3 ***	191.2	56.3	22.5	87.5	15166.0 ***	9097.4	215.1	43.4	1044.5
PL 2013	288	177.3 ***	111.4	64.1	32.5	86.5	19299.4 ***	9212.6	270.2	55	640
GI 2014	337	558.8 ***	82.7	54.4	6	88	139.7 ***	53.2	32.1	6.7	56.3
PL 2014	337	471.8 ***	179.9	43.8	2.5	83	17210.5 ***	10265.4	251.3	60	760

Significance level: *** 0.001.

Table 5. Genotypic variances (mean squares, MS) and descriptive statistical traits for the climate chamber experiment (df = 329). Genotypic variances were computed using a general linear model in which genotypes were considered as fixed and replicates as random effects (see Material and Methods).

Trait	MS	Error	Mean	Min	Max
Emergence (%)	1222.4 ***	135.2	80.2	17.2	100
Emergence Index (EI)	18.9 ***	4.5	17.7	12.5	25.5
Shoot dry weight (SDW) (mg)	7.9 ***	0.9	5.6	2.1	9.2
Root dry weight (RDW) (mg)	6.3 ***	1.1	3.3	1.1	12.1
Leaf Greenness	7.8 ***	0.6	5.2	1	8.3

Significance level: *** 0.001.

Table 6. Variances (mean squares) and heritability for emergence and SDW over all five environments. G, E, G × E, and error-variance were computed using a general linear model in which genotypes and environments were considered as fixed and replicates as random effects. For heritability estimation, a fully random model was applied (see Materials and Methods).

Source	df	Emergence	Shoot Dry Weight
Genotype (G)	337	1209.2 ***	16921.4 ***
Environment (E)	4	176414.4 ***	12773831.5 ***
G × E	1243	342.5 ***	9250.2 ***
Error	2245	138.2	3915.1
h ²		0.74	0.41

Significance level: *** 0.001.

All collected phenotype data of the diversity set regarding chilling tolerance and juvenile development are shown in detail in Table S2, Supplementary materials.

Pearson's correlations among traits and environments (Figure 1) were significant in most cases (57 out of 78), but generally only low to medium. Higher correlations between the two locations GI and PL ($r = 0.70$ *** for emergence and 0.49 *** for SDW) were observed under the early sowings of 2014. In contrast, under the less stressed conditions of 2013, these correlations were lower, and also the correlations between 2013 and 2014 at one location were relatively low. The correlation between the climate chamber and field experiments differed depending on the level of stress in the latter ones. Emergence and SDW of the climate chamber showed the highest correlations to GI 2014 ($r = 0.44$ *** and 0.49 ***), which had the most similar stress conditions, while the correlations to the other environments were lower, but still significant. RDW scored in the climate chamber displayed only weak correlations to field emergence and SDW. Also, leaf greenness evaluated after four weeks at constant 13/10 °C did not show a relation to the field trials, which had notably higher daily temperatures.

3.2. Phenotypic Variation for Maturity and Bioenergy Related Agronomical Traits

The present diversity set showed a high variation for maturity and bioenergy related traits as well (Tables 7–9). Highly significant differences for days to flowering (DTF) were observed at GG and PL, but surprisingly not at RH, which may be attributed to the conditions there being quite different in 2013 compared with 2014. The late sowing at RH in 2013, followed by adverse conditions (drought and an unusual cold spell by end of June), apparently induced a different reaction in time to flowering among the genotypes as compared with 2014, where the sowing was earlier and conditions for sorghum more favorable. As expected, the flowering in the cooler environments of RH and PL was substantially delayed compared with the warmer environment of GG (98 and 102 DTF vs. 78 DTF on average, respectively). Moreover, the number of inbred lines not reaching anthesis increased in the cooler environments (11% at RH and 6% at PL vs. 2% at GG). Concordantly, the dry matter content at harvest (DMC) was significantly lower at RH compared with GG (24.6% vs. 29.3% on average).

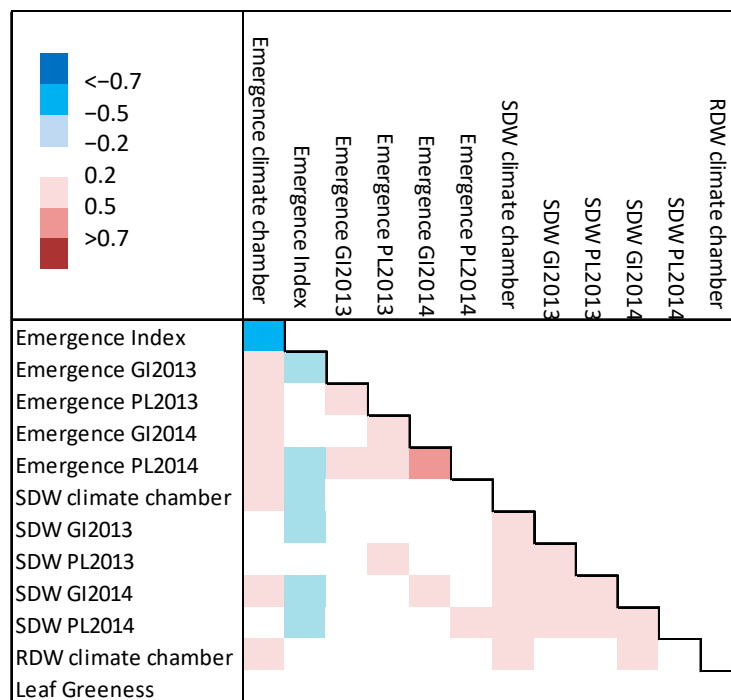


Figure 1. Heatmap showing Pearson's correlation coefficients (r) among traits for chilling tolerance and juvenile development. All highlighted correlations are significant at 0.001 level. SDW, shoot dry weight; RDW, root dry weight; GI, Giessen; PL, Poel.

All collected phenotype data of the diversity set regarding maturity and bioenergy related traits are shown in detail in Table S3, Supplementary material.

The maturity traits DTF and DMC were negatively correlated as expected (Figure 2), but the magnitude of their relation differed between GG ($r = -0.56^{***}$) and RH ($r = -0.29^{***}$).

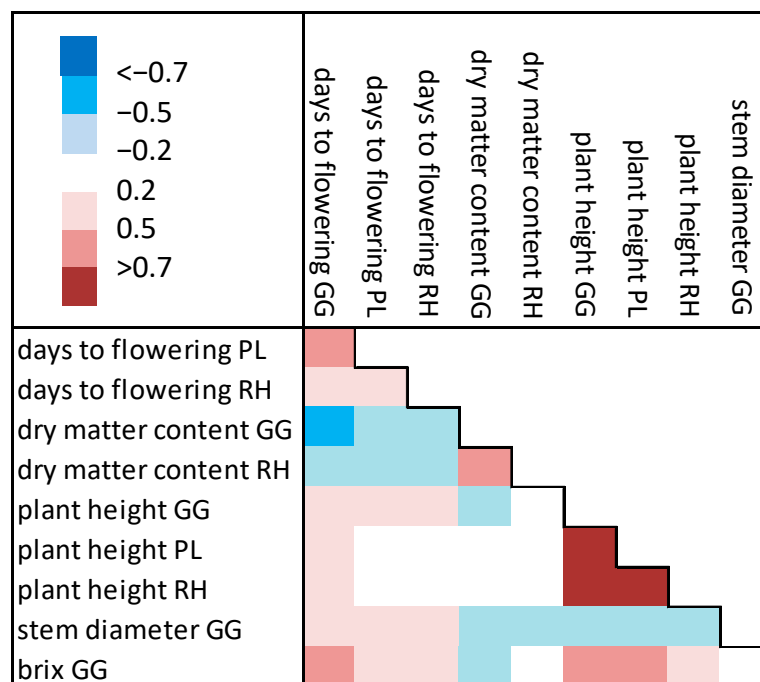


Figure 2. Heat-map showing Pearson's correlation (r) among different agronomical traits. All highlighted correlations are significant at 0.001 level. RH, Rauischholzhausen; GG, Gross-Gerau.

Table 7. Genotypic variances (mean squares, MS) and descriptive statistical traits for days to flowering, dry matter content, and plant height, separately for the different environments. Genotypic variances were computed using a general linear model in which genotypes were considered as fixed and replicates as random effects (see Material and Methods).

Environment	Days to Flowering (DTF)							Dry Matter Content (%) (DMC)							Plant Height (cm)						
	df	MS	Error	Mean	Min	Max	df	MS	Error	Mean	Min	Max	df	MS	Error	Mean	Min	Max	df	MS	Error
GG	329	211.7 ***	119.6	77.1	51	111	334	30.8 ***	6.4	29.2	18.9	45.6	329	3459.9 ***	352.5	136	43	353			
RH	298	205.5	239.4	96	65	129	295	13.8 ***	6.0	24.7	16.6	37.5	298	3895.7 ***	505.6	136	42	330			
PL	317	192.2 ***	72.3	100	67	130	-	-	-	-	-	-	329	4265.0 ***	507.8	142	60	330			

Significance level: *** 0.001.

Table 8. Genotypic variances (mean squares, MS) and descriptive statistical traits for brix and stem diameter, separately for the different environments. Genotypic variances were computed using a general linear model in which genotypes were considered as fixed and replicates as random effects (see Material and Methods).

Environment	Brix (%)							Stem Diameter (cm) (SD)						
	df	MS	Error	Mean	Min	Max	df	MS	Error	Mean	Min	Max	df	MS
GG 2012	321	52.4 ***	4.0	12.4	3.3	21.3	321	0.42 ***	0.04	1.75	0.7	2.77		
GG 2013	333	41.7 ***	3.3	13.5	3.3	21	374	0.42 ***	0.04	1.63	0.77	2.7		
GG 2014	337	45.8 ***	3.2	13.7	4	22.3	378	0.39 ***	0.03	1.63	0.63	3.13		

Significance level: *** 0.001.

Table 9. Variances (mean squares, MS) and heritability for agronomical traits over all environments. G, E, G x E, and error-variance were computed using a general linear model in which genotypes and environments were considered as fixed and replicates as random effects.

Source	DTF			Dry Matter Content			Plant Height			Brix			Stem Diameter		
	df	ms	df	ms	df	ms	df	ms	df	ms	df	ms	df	ms	df
Genotype (G)	334	397.9 ***	337	37.3 ***	334	9307.7 ***	337	91.4 ***	337	412.1 ***	337	0.93 ***			
Environment (E)	2	110119.4 ***	1	7489.0 ***	2	22511.8 ***	2	23.4 ***	2	654	1987	0.04			
G x E	610	89.0	337	7.0	610	533.4 **	654	3.5	654	1987	0.82				
Error	614	141.4	863	6.4	614	454.5	1987	0.72	1987	0.04					
h ²		0.80		0.83		0.96		0.72							

Significance level: *** 0.001; ** 0.01.

Late maturity was associated with higher brix values ($r = 0.53$ *** for DTF and $r = -0.30$ *** for DMC), SD, and tallness. While brix was correlated with tallness ($r = 0.55$ ***), no relation to SD was observed.

3.3. Adaptation to Cooler Climates

To identify useful lines with a good adaptation to Central Europe, the 5% best performing genotypes (based on their mean over all environments) for emergence and juvenile SDW under field conditions, and the 5% inbred lines with the earliest anthesis, were further dissected for their stability, expressed by the weighted sum of the first and second principal component. The inbred line PI602736 showed the highest field emergence on average (77.6%), but SC614 and SC1201 had a similar mean emergence (73.6% and 73.8%, respectively) combined with a higher stability, as shown by the lower sum of PC1 and PC2 (Figure 3a). For SDW, SC702 represents the most interesting accession, having the second highest mean value (341.5 mg) and best stability. SC52 had a similar mean SDW (343.6 mg), but was less stable; however, it was one of the best performers at GI 2014 (the field experiment with most severe cold stress). Furthermore, this inbred line was among the top 5% for both emergence and SDW, together with SC748 and PI599701. For DTF, SC609, SC942, and SC1103 showed the earliest flowering on average. While SC942 and SC1103 are fodder types with a *bicolor* $\times$ *sudanense* background, SC609 is a grain type of the race *guinea* originating from China. Even though SC1214 (*caudatum-guinea* grain type) flowered two days later on average than the previously mentioned genotypes, it showed the best stability for earliness. Interestingly, SC352 and SC614 combined early flowering with high SDW and emergence, respectively.

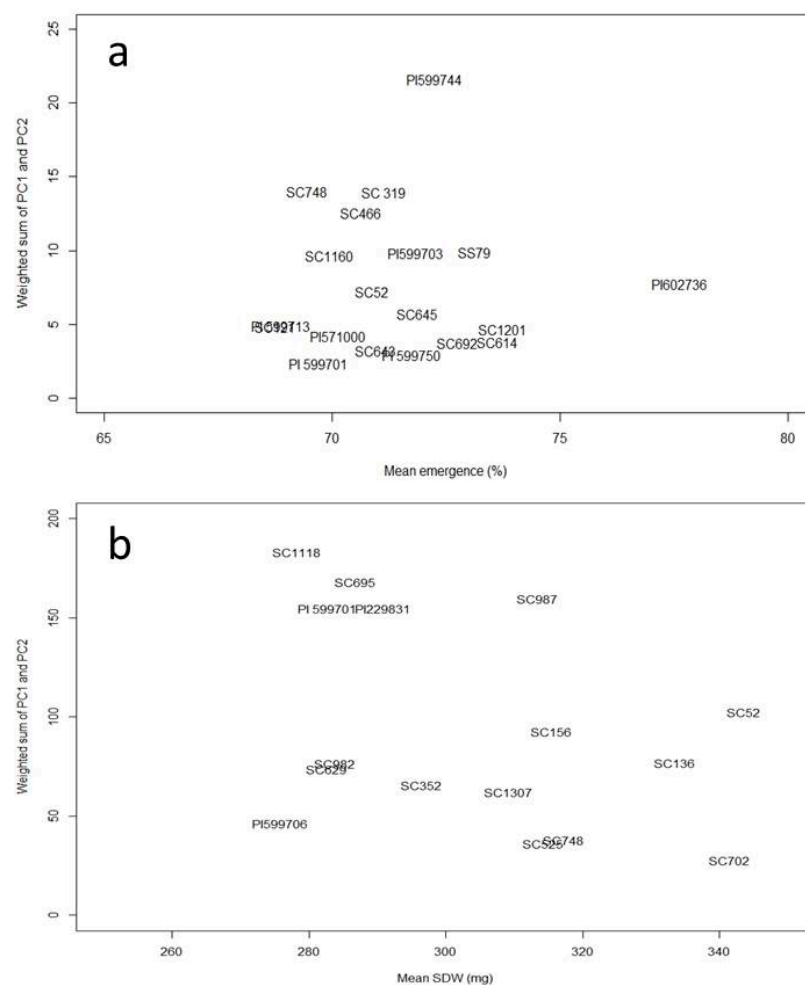


Figure 3. Cont.

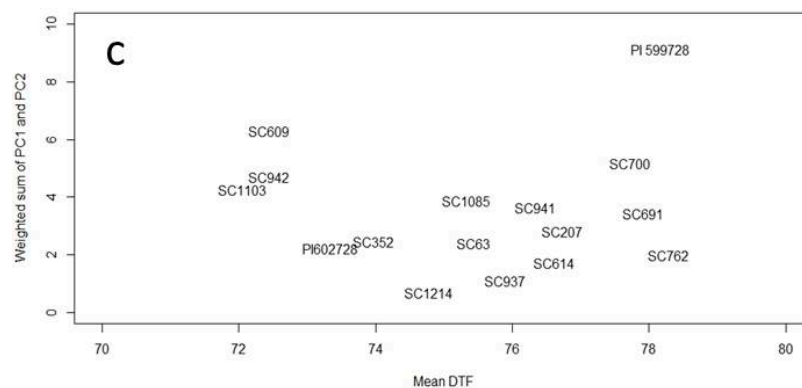


Figure 3. Mean values and stability, depicted as weighted sum of PC1 and PC2, of the top 5% ($n = 19$) (a) performing genotypes for field emergence; (b) juvenile shoot dry weight (SDW); and (c) days to flowering (DTF).

3.4. Population Structure of the Diversity Panel

The neighbor-joining method [58] shows that the present diversity set clusters into five phylogenetic groups, which are principally based on geographic origin and morphotype (Figure 4). Only group 2, which is determined rather by the ideotype (biomass and sweet sorghum types) than by race and origin, does not fit into this scheme.

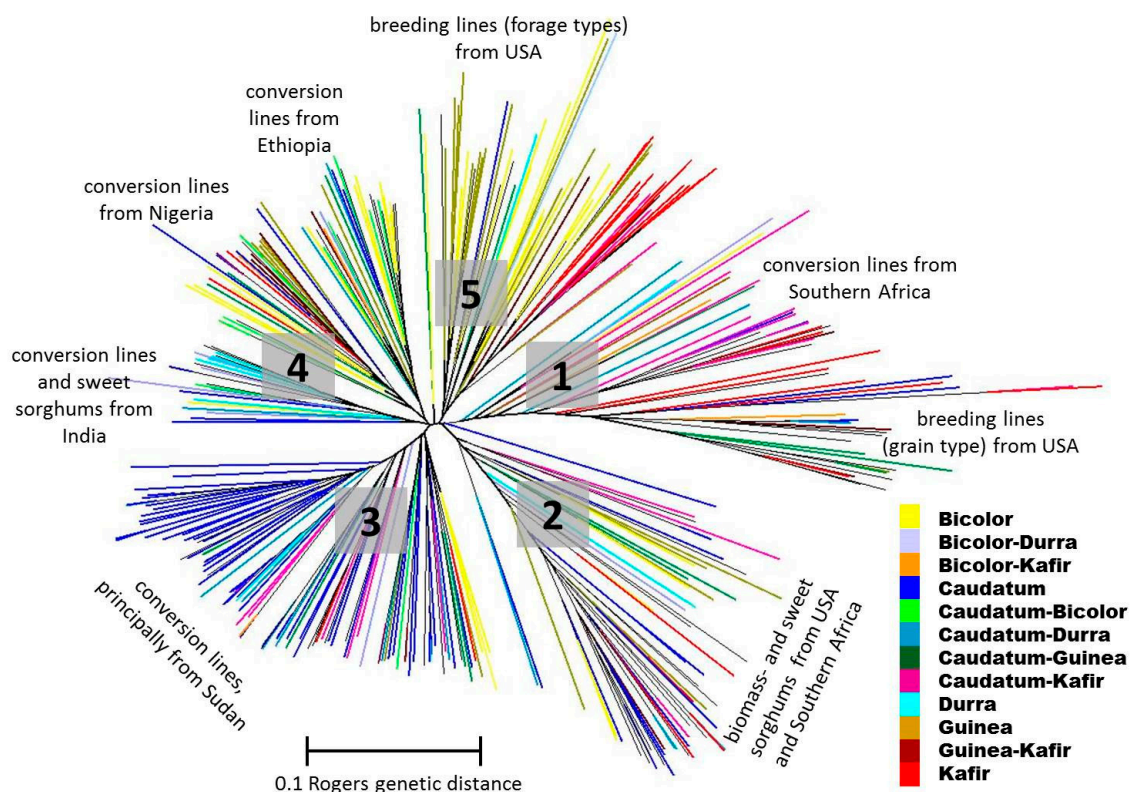


Figure 4. Phylogram displaying the genetic relatedness in the present sorghum diversity set ($n = 338$) by the neighbor-joining method, showing that clustering in groups is predominantly based on geographic origin and race.

3.5. Genome Wide Association Study for Early Cold Tolerance Traits

After removing SNPs with more than 10% missing data and a minor allele frequency $<5\%$, 1507 SNPs remained for the association studies. For the field trials, only in the particular environment of

GI 2014 (which had the hardest stress conditions), significant marker-trait associations were found (two for emergence and one for SDW). In contrast, under controlled conditions, we found in total 12 significant SNP-trait associations for the traits RDW, emergence (%), emergence index, and leaf greenness (Table S4, Supplementary material). The following Manhattan plots depict marker-trait associations for SDW (GI 14), EM (GI 14), SDW (climate chamber, CC), EM (CC), RDW (CC), EI (CC), and LG (Figure 5).

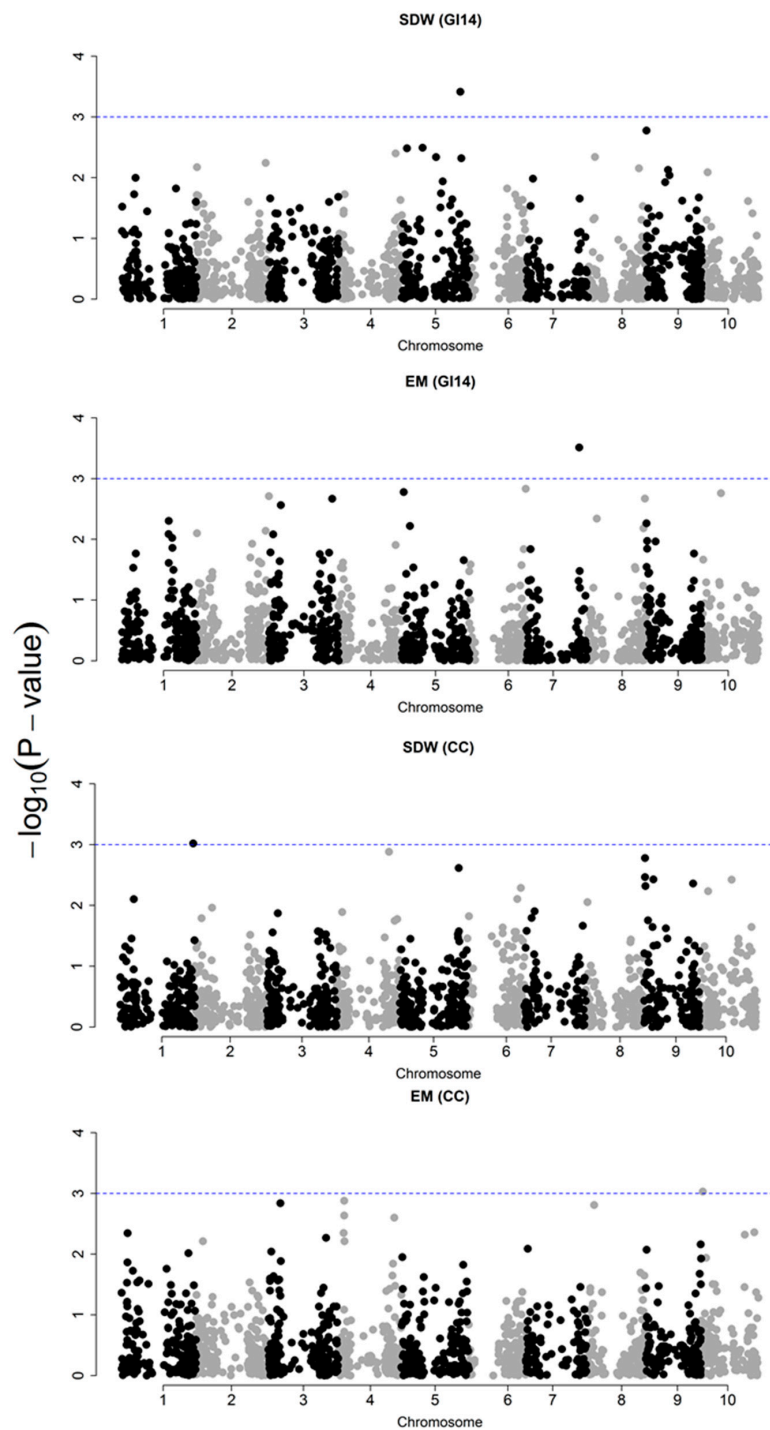


Figure 5. Cont.

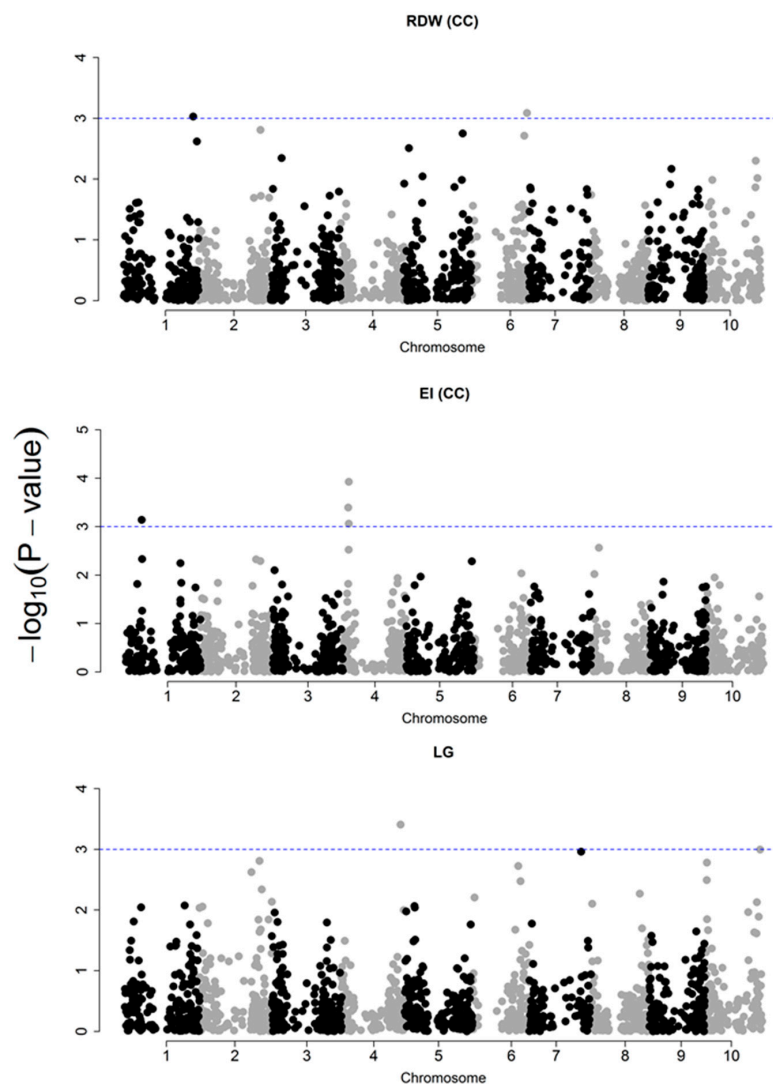


Figure 5. Manhattan plots showing p values and marker–trait associations for different chilling-tolerance related traits. Blue horizontal line indicate threshold for significant marker–trait associations ($p < 1 \times 10^{-3}$). CC, climate chamber; EM, emergence; EI, emergence index; LG, leaf greenness.

3.6. Genome-Wide Association Studies for Agronomical Traits

In total, we found 46 significant SNP–trait associations, all with minor effects on phenotypic variation (Table S4, Supplementary material). For PH, SNP UGSDII_09970 (SB-06) explained 8.7% of the phenotypic variation, being the marker with the highest impact among all traits. For the other agronomical traits, the phenotypic variation explained by the specific SNP–trait association was less than 8%. Significant SNP–trait associations for PH were found on four different chromosomes (Table S4, Supplementary material). Figures 6 and 7 show the marker–trait associations for PH and for SD and brix, respectively, as Manhattan plots. For the remaining traits, the marker–trait associations are depicted in the Supplementary material (Figures S1–S3).

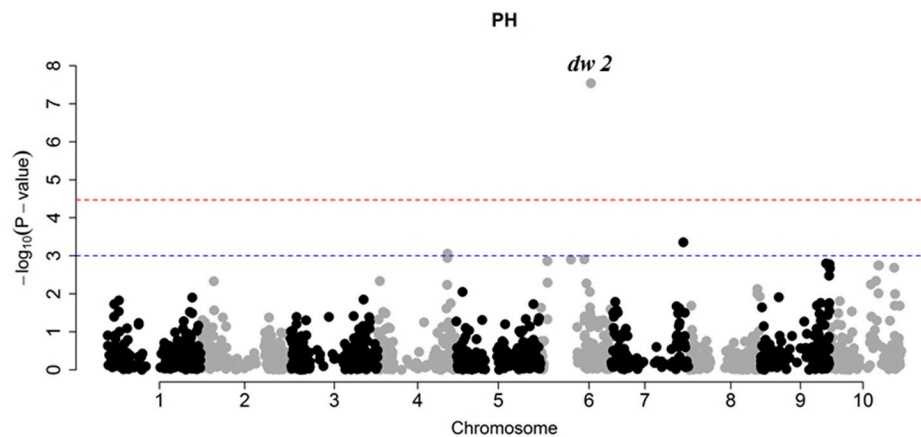


Figure 6. Manhattan plot showing p -values and marker–trait associations for PH. Red and blue horizontal lines indicate thresholds for significant marker–trait associations after Bonferroni correction ($p < 3.32 \times 10^{-5}$, $0.05/N$) and weak associations ($p < 1 \times 10^{-3}$). The known plant height gene *dw2* is marked in the plot.

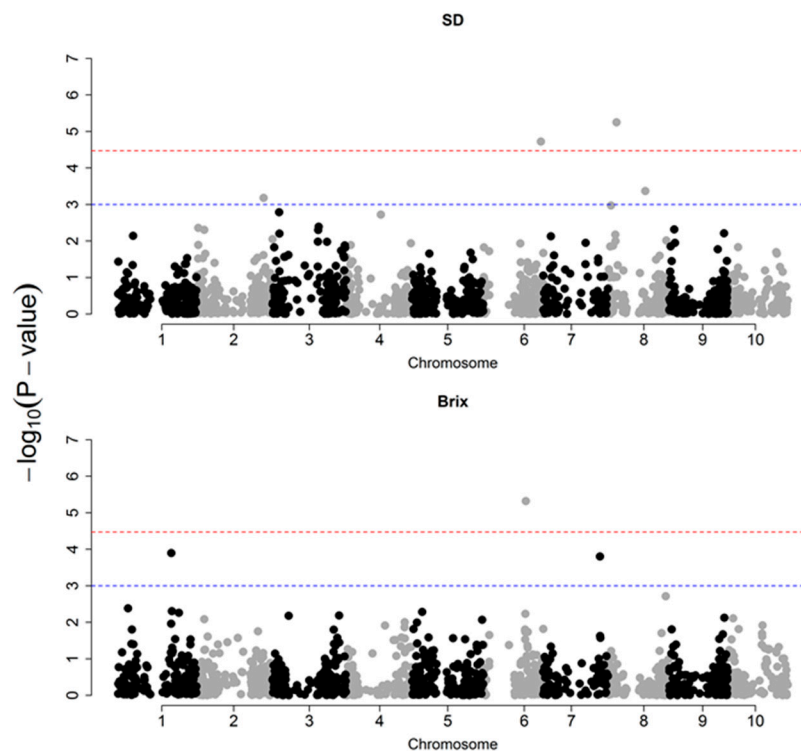


Figure 7. Manhattan plots showing p values and marker–trait associations for SD and Brix. Red and blue horizontal lines indicate thresholds for significant marker–trait associations after Bonferroni correction ($p < 3.32 \times 10^{-5}$, $0.05/N$) and weak associations ($p < 1 \times 10^{-3}$).

4. Discussion

4.1. Phenotypic Variation for Chilling Tolerance and Juvenile Development

The observed heritabilities of $h^2 = 0.74$ for emergence and 0.41 for SDW are in line with those published by Fiedler et al [7]. The heritability for SDW is the lowest among the traits scored in the present study and underlines the high amount of $G \times E$ interaction. However, taking into account that this trait actually represents (early) biomass yield, the observed heritability of 0.41 is not so surprising, as for yield itself, only medium heritabilities are usually reported, too.

RDW scored in the climate chamber displayed only weak correlations to field emergence and SDW, which would not justify its laborious assessment in a practical breeding program. Even though leaf greenness scored under controlled cold stress did not show a relation to field performance either, we do consider this trait an efficient selection tool for cold tolerance of autotrophic growth (see Section 4.5).

4.2. Phenotypic Variation for Maturity and Bioenergy Related Agronomical Traits

While high heritability for plant height (0.96) could be expected, stem diameter (0.82) showed a high heritability, confirming the results of Zhao et al. [33], who reported a heritability of 0.88 for stem circumference. Both maturity traits DTF and DMC showed a comparable heritability (0.80 and 0.83, respectively). The heritability for brix in our study (0.72) is in a similar range as observed in another diversity panel (0.81) by Burks et al. [38].

The traits DTF and DMC were negatively correlated, but the magnitude of their relation differed among GG and RH, probably as a result of a different panicle: stem ratio. At the warmer location of GG, the ratio of panicles/grains on whole-plant dry matter was higher, owing to a better seed set and a more advanced seed maturity. Hence, the high correlation between DTF and whole-plant DMC observed at GG was not surprising, as a high correlation between DTF and seed DMC under Central European conditions was already reported by Windpassinger et al [8]. In contrast, at RH, the relative importance of grains on whole-plant dry matter was low because of the late flowering, and for stem and leaves, only a low correlation between DTF and component-specific DMC was reported [8].

The observed correlation between brix and tallness ($r = 0.55^{***}$) coincides with results reported by Shiringani et al [41]. However, a recent study [44] showed that the tallness of sweet sorghum cultivars is likely to be the result of selection for total sugar yield (which is obviously higher in tall plants) rather than physiologically or genetically determined. Concordantly, the positive correlation between brix and DTF ($r = 0.53^{***}$) observed here could also be the result of the selection for tall and late-flowering sweet sorghums. Surprisingly, the negative correlation between brix and DMC ($r = -0.30^{***}$) was relatively low, facilitating the breeding for cultivars with a high stem digestibility, but still an adequate maturity. Stem diameter was not associated with brix, being in concordance with previous studies [36,41], but showed a low negative correlation ($r = -0.25^{***}$) with plant height, which was also described by the authors of [41], but not found in the study of [36]. Further, SD was weakly correlated with DTF and DMC, with early maturity going on the expense of stem thickness, as was to be expected.

4.3. Lines with a Good Adaptation to Cooler Climates

The accessions previously highlighted combine a good and stable early cold tolerance with early maturity, hence representing valuable base material for the breeding of sorghum towards a better adaptation in cool temperate areas. These results show that among the sorghum conversion lines, interesting sources for cold tolerance can also be found. In contrast to Chinese *kaoliang* types, which are the commonly described donors for cold tolerance, albeit their generally poor agronomic performance (e.g., low disease tolerance and yield potential) [60,61], the conversion lines are more amenable base material for utilization in temperate breeding programs. Further, some brown-midrib lines also excelled in cold tolerance and early flowering, showing that the desirable *bmr*-trait is no penalty for temperate-adaptation.

4.4. Population Structure of the Diversity Panel

The phylogenetic structure of the present diversity set (Figure 4) confirms the results of [62,63]. Nonetheless, group 2, consisting mainly of biomass and sweet sorghum types, does not fit into this scheme, as it is based on the ideotype (crop type) and not on morphotype (race) or origin. This seems somehow surprising, as the authors of [64] reported that sweet sorghum lines cluster with grain sorghums of similar racial origin, suggesting a polyphyletic origin of sweet sorghum, which is also supported by the high diversity found among sweet sorghum accessions [43]. Also, in the present

study, sweet and grain sorghums of the race *durra* originating in India cluster together within group 4. Thus, the clustering of sweet- and biomass-types in group 2 might be explained by separate breeding programs and their geographic origin in Southern Africa, which was one of the main sources for sorghum germplasm introductions into the USA [65].

4.5. Genome-Wide Association Studies for Juvenile Chilling Tolerance

In temperate Europe and other high-latitude areas of the world, early season cold stress is one of the major obstacles for sorghum production. Enhancements of emergence and early vigor under suboptimal temperature conditions can facilitate earlier sowings and increase the yield potential. Several publications describe different methods for the dissection of early season cold tolerance [7,10,11,17]. The present study analyzed the broadest diversity set ($n = 338$) so far for cold tolerance traits under both field and controlled environment conditions via GWAS. In contrast to QTL-studies on bi-parental populations, GWAS captures a much higher amount of genetic diversity, also considering ancient recombination events.

Our results (Table S4) confirm juvenile cold tolerance of sorghum being a highly quantitative trait with multiple physiological pathways involved, as already shown in previous studies [19,22,53]. Most of the QTL described in these studies lie nearby genes involved in the anthocyanin and carbohydrate metabolism.

Even though in our experiments, only a weak correlation between RDW under controlled stress conditions and field experiments was observed, a proper root development also under adverse soil- and temperature conditions is essential for a satisfying establishment; subsequent water and mineral uptake; and, ultimately, a high yield [66]. A lethal decline in leaf relative water content caused by a chilling induced reduction in root conductance was observed in maize and rice roots [67,68]. Hund et al. [69,70] reported that root architecture in maize was also influenced by early season chilling stress. Bekele et al. [10] highlighted the importance of root development and structure on early sorghum cold tolerance, and described SB-01 and SB-06 as a source of genomic regions influencing several root traits.

Three SNPs, inter alia SNP UGSS_03534 located on SB-04, showed a significant SNP–trait interaction for leaf greenness. Photosynthesis is considered one of the most chilling-susceptible processes in plants [71]. Prolonged chilling stress induces chlorosis, which can aggravate into complete and irreversible etiolation due to chlorophyll degradation among susceptible genotypes (see Figure 8). Hence, the ability of sorghum to maintain leaf greenness under cold indicates stress tolerance of the photosynthetic apparatus and, furthermore, a successful switch from heterotrophic to autotrophic growth. Also, for maize, leaf greenness was reported as an important and easily scorable trait [72]. The high variation for cold tolerance of the photosynthetic apparatus observed in the present study by a simple scoring method coincides with the results of [73], who conducted extensive analyses on different photosynthetic parameters like carbon assimilation, transpiration rate, and stomatal conductance.



Figure 8. Differential reaction of the inbred lines to constant 13/10 °C for four weeks shows the high variation for cold tolerance in the diversity set studied.

Emergence as a product of successful germination and sufficient seedling vigor is also a crucial trait for the estimation of cold tolerance in different plant species. Under controlled stress conditions (13/10 °C), we localized only one SNP–trait interaction on SB-10. In addition to (final) emergence, we also analyzed the trait emergence index (EI), which considers also the speed of emergence. Three out of four significant SNPs for EI were localized on SB-04.

To summarize, early chilling tolerance is a highly quantitative trait that is influenced by many small-effect genes, most likely governing multiple physiological pathways. We identified several significant SNPs for diverse cold-tolerance related traits. However, we are aware that the relatively low marker coverage of the used 3K-SNP Chip implies some limitations. With a higher marker density, more significant marker–trait associations might have been detected, and candidate gene analysis could be conducted to get more insights into the physiology behind cold tolerance in sorghum. Nevertheless, association studies on sorghum cold tolerance using a much higher marker density showed the highly quantitative character of this trait. For instance, the authors of [21] performed GWAS using approximately 162,000 SNPs and found only one marker locus significantly associated with sorghum low temperature germination and none with vigor. For practical breeding, the highly quantitative character of cold tolerance traits strongly limits the possibilities of marker-assisted selection. As sorghum cold tolerance traits have been shown to be heterotic and with a generally low correlation between per se and hybrid performance [11], for applied sorghum hybrid breeding QTL-studies which focus on combining ability instead of per se performance or genomic prediction will be more promising.

4.6. Genome-Wide Association Studies for Bioenergy Related Agronomical Traits

The present diversity set shows a high variation for the five agronomical traits plant height (PH), stem diameter (SD), brix, days to flowering (DTF), and dry matter content (DMC) (see Section 4.2).

Our detected associations for PH on SB-06 and SB-07 (Table S4) most probably correspond to the well-known sorghum plant height genes *dw2* and *dw3* [27,74,75].

For DTF, we found different significant genomic regions (Table S4). However, the SNP–trait associations are not consistent over the three locations. For DTF at the southernmost and warmest site, Gross-Gerau (GG), we found four significant SNP-trait associations. At PL, the northernmost location with the longest days in summer, we found more SNPs for DTF than in GG. Considering that most of the accessions in our diversity panel probably have the same configuration of *ma*-alleles, allowing for flowering even under extreme long-day conditions, the quantitative character of DTF with environment-specific QTL found in this study is not surprising and confirms previous results. Mace et al. [76] identified 40 small-effect QTL influencing sorghum flowering time in Australia. Adequate flowering time is a critical, site-specific adaptation trait with a high impact on yield. The marker–trait associations identified for PL are of special interest because they provide insights how an originally tropical short-day plant can achieve flowering even under cool temperatures and extreme day lengths.

For dry matter content (DMC), we found more significant SNP–trait associations under the cooler environment of RH than at the warmer location GG (six vs. one). SNP UGSDI_29686 is of special interest, as it is not only significant for RH alone, but remains significant also when considering the mean values of both locations, RH and GG. Gene expression scenarios for this genomic region in Phytozome v12.1 showed a high expression during anthesis and grain maturity. These results confirm the strong relation between DMC and DTF, as was to be expected. However, for the breeding of bioenergy sorghum, correlation breakers showing late flowering going along with a high yield potential, but still sufficient DMC due to lower moisture content in stem and leaves, would be of special interest. Unfortunately, we could not detect SNPs for DMC, which are detached from flowering time regulation.

For stem diameter (SD), we found three significant SNP–trait associations on SB-06 and -08, with two of them even passing the high-significance threshold. The literature on the genetic architecture underlying SD is limited to only a few publications. Shiringani et al. [41] identified 13 QTL for SD in a recombinant inbred line (RIL) population, clearly indicating it as a quantitative trait. Zou et al. [77]

described, in a bi-parental population, three QTL for SD under long day conditions on SB-04 and -06, all with minor impacts of the phenotypic variation. Furthermore, the authors of [33] detected 36 QTL in a diversity set and found six significant marker trait associations on five different chromosomes with GWAS. Their experiments were carried out in Iowa, which has higher average temperatures in summer and a more intense sunlight than Central Europe, owing to the lower latitude ($\sim 41^\circ$ vs. $\sim 50^\circ$) and continental climate. However, the SNP UGSDI_29686 identified in the present study is located on SB-06, most probably close to the SNP described by the authors of [33], indicating its environmental stability. On the whole, our results coincide with the previous studies regarding the quantitative character of this important bioenergy trait. Nonetheless, the two highly significant SNPs found in our broad diversity set deserve further interest and fine-mapping for marker development.

For brix, we found three significant SNP-trait associations on SB-01, -06, and -07. These associations have a minor phenotypic impact of below 6%. The polygenic character of brix found in our experiments coincides with several studies [32,36,39]. *S. bicolor* is closely related to sugarcane, and sweet sorghum is widely used for biofuel and sugar-syrup production. These sweet types are characterized by a juicy stem with a high amount of soluble sugars. However, beyond these classical sweet sorghums, our scorings show that other sorghum crop types such as dual-purpose types can have also sugar in their stems, even though their juice volume is lower. Several mapping studies detected QTL for brix on nearly all sorghum chromosomes. In our study, the SNP UGSDII_09970, which is highly significant for PH, matches also for brix (Table S4). Owing to the phenotypic correlation of plant height and brix, the identification of a common QTL is not surprising. Sweet sorghum types are usually rather tall, and in our diversity panel they are also notably taller than the grain type conversion lines. However, as described by the authors of [44] and already previously outlined, the tallness of sweet sorghum seems to be rather the result of both intended or natural selection than physiological causes.

Most of the QTL cited and discussed for the aforementioned traits were identified in specific, bi-parental populations. Using a diversity panel as in our study, both the number of significant marker-trait associations and their impact tend to decrease. As already outlined, the relatively low SNP coverage implies some limitations to the present study. Nevertheless, the principal findings regarding the quantitative character of most cold tolerance and agronomical traits are in line with other studies, and novel genomic regions influencing these traits under the particular high-latitude conditions of Central Europe could be identified.

5. Conclusions

For a successful implementation as a novel bioenergy and fodder crop in temperate Central Europe, sorghum needs significant enhancements in cold tolerance and early maturity. Further, depending on the intended crop type or ideotype, an adequate plant architecture and composition, expressed by traits such as plant height, stem diameter, and brix, are essential. Our study evaluated the broadest diversity set so far for these traits under both Central European field conditions and controlled environments, identifying novel, publicly available sources for cold tolerance and temperate-adaptation. The high amount of both phenotypic and genetic variation, along with satisfying heritabilities in most cases, underlines that a robust breeding progress for these complex quantitative traits is feasible. The genome-wide association studies (GWAS) conducted in this study confirm a highly quantitative character for most bioenergy and cold tolerance related traits. Interestingly, novel genomic regions influencing sorghum cold tolerance and adaptation could be identified, which should be further analyzed in fine-mapping approaches. However, for practical breeding, the highly quantitative trait characteristics imply serious limitations for marker-assisted selection in genetically diverse material.

Supplementary Materials: The following are available online at <http://www.mdpi.com/2073-4395/9/9/535/s1>, Table S1: List of all sorghum accessions composing the present diversity set ($n = 338$), including origin, SC- and PI-Numbers when available, Table S2: Mean values of the cold tolerance and bioenergy related traits, Table S3: Mean values of the cold tolerance and bioenergy related traits, Table S4: Significant SNP-trait associations for the considered traits., Figure S1: Manhattan plot showing p values and marker-trait associations for PH_GG, PH_RH and PH_PL. Blue horizontal line indicate threshold for significant marker-trait associations ($p < 1 \times 10^{-3}$),

Figure S2: Manhattan plot showing p values and marker–trait associations for DMC, DMC_GG and DMC_RH. Blue horizontal line indicate threshold for significant marker–trait associations ($p < 1 \times 10^{-3}$)., Figure S3: Manhattan plot showing p values and marker–trait associations for DTF, DTF_GG, DTF_RH and DTF_PL. Blue horizontal line indicate threshold for significant marker–trait associations ($p < 1 \times 10^{-3}$).

Author Contributions: A.S. and S.W. contributed equally to this manuscript and are both listed as first authors in consequence. B.W. devised the study. W.F. and R.S. received the funding. S.W. planned and oversaw the field trials and climate chamber experiments. A.S. conducted the data analysis. A.S. and S.W. interpreted the results and wrote the manuscript. B.W. edited the manuscript.

Funding: This research was funded by FNR (Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e. V., Germany) grants 22006911 and 22007011.

Acknowledgments: For excellent trial management and scorings, we thank Norddeutsche Pflanzenzucht Hans-Georg Lembke KG (NPZ) in general and Bärbel Frenz in particular for trials at Poel, Karlheinz Balzer and field team for trials at Rauischholzhausen, Malte Luh and Martin Seim for trials at Giessen, and Mario Tolkendorf and field team for trials at Gross-Gerau. For competent technical assistance during the climate chamber trials, we thank Birgit Keiner, Mona Nehl, Annette Plank, Svetlana Renner, and Nelly Weis. For helpful discussions regarding GWAS, we thank Iulian Gabur. Last, but not least, we thank USDA-ARS for providing the original germplasm.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

Abbreviations

CC	climate chamber
DTF	days to flowering
DMC	dry matter content
EI	emergence index
EM	emergence
GWAS	genome wide association study
LG	leaf greenness
PH	plant height
QTL	quantitative trait loci
RCBD	randomized complete block design
RDW	root dry weight
RIL	recombinant inbred line
SD	stem diameter
SDW	shoot dry weight
SNP	single nucleotide polymorphism

References

1. Paterson, A.H.; Bowers, J.E.; Bruggmann, R.; Dubchak, I.; Grimwood, J.; Gundlach, H.; Haberer, G.; Hellsten, U.; Mitros, T.; Poliakov, A.; et al. The Sorghum bicolor genome and the diversification of grasses. *Nature* **2009**, *457*, 551–556. [[CrossRef](#)]
2. Mace, E.S.; Jordan, D.R. Integrating sorghum whole genome sequence information with a compendium of sorghum QTL studies reveals uneven distribution of QTL and of gene-rich regions with significant implications for crop improvement. *Theor. Appl. Genet.* **2011**, *123*, 169–191. [[CrossRef](#)]
3. Muraya, M.M. Sorghum Genetic Diversity. In *Genetics, Genomics and Breeding of Sorghum*; Wang, Y.-H., Upadhyaya, H.D., Kole, C., Eds.; CRC Press Taylor & Francis Group: Boca Raton, FL, USA, 2014; pp. 114–140.
4. Venkateswaran, K.; Muraya, M.; Dwivedi, S.L.; Singh, S.K. Wild Sorghums-Their Potential Use in Crop Improvement. In *Genetics, Genomics and Breeding of Sorghum*; Wang, Y.-H., Upadhyaya, H.D., Kole, C., Eds.; CRC Press Taylor & Francis Group: Boca Raton, FL, USA, 2014; pp. 56–89.
5. Monk, R.; Franks, C.; Dahlberg, J. Sorghum. In *Yield Gains in Major U.S. Field Crops*; ACSESS: Madison, WI, USA, 2014.
6. Tari, I.; Laskay, G.; Takacs, Z.; Poor, P. Response of sorghum to abiotic stresses: A review. *J. Agron. Crop. Sci.* **2013**, *199*, 264–274. [[CrossRef](#)]
7. Fiedler, K.; Bekele, W.A.; Friedt, W.; Snowdon, R.; Stützel, H.; Zacharias, A.; Uptmoor, R. Genetic dissection of the temperature dependent emergence processes in sorghum using a cumulative emergence model and stability parameters. *Theor. Appl. Genet.* **2012**, *125*, 1647–1661. [[CrossRef](#)]

8. Windpassinger, S.; Friedt, W.; Frauen, M.; Snowdon, R.; Wittkop, B. Designing adapted sorghum silage types with an enhanced energy density for biogas generation in temperate Europe. *Biomass Bioenergy* **2015**, *81*, 496–504. [[CrossRef](#)]
9. Yu, J.; Tuinstra, M.R. Genetic analysis of seedling growth under cold temperature stress in grain sorghum. *Crop. Sci.* **2001**, *41*, 1438–1443. [[CrossRef](#)]
10. Bekele, W.A.; Fiedler, K.; Shiringani, A.; Schnaubelt, D.; Windpassinger, S.; Uptmoor, R.; Friedt, W.; Snowdon, R.J. Unravelling the genetic complexity of sorghum seedling development under low-temperature conditions. *Plant. Cell Environ.* **2014**, *37*, 707–723. [[CrossRef](#)]
11. Windpassinger, S.; Friedt, W.; Deppé, I.; Werner, C.; Snowdon, R.; Wittkop, B. Towards enhancement of early-stage chilling tolerance and root development in sorghum F1 hybrids. *J. Agro. Crop Sci.* **2016**, *203*, 146–160. [[CrossRef](#)]
12. Singh, S.P. Sources of cold tolerance in grain sorghum. *Can. J. Plant Sci.* **1985**, *65*, 251–257. [[CrossRef](#)]
13. Salas-Fernandez, M.G.; Schoenbaum, G.R.; Goggi, A.S. Novel germplasm and screening methods for early cold tolerance in sorghum. *Crop Sci.* **2014**, *54*, 2631–2638. [[CrossRef](#)]
14. Maulana, F.; Weerasooriya, D.; Tesso, T. Sorghum Landrace Collections from Cooler Regions of the World Exhibit Magnificent Genetic Differentiation and Early Season Cold Tolerance. *Front. Plant Sci.* **2017**, *8*, 756. [[CrossRef](#)]
15. Yu, J.; Tuinstra, M.R.; Claassen, M.M.; Gordon, W.B.; Witt, M.D. Analysis of cold tolerance in sorghum under controlled environment conditions. *Field Crops Res.* **2004**, *85*, 21–30. [[CrossRef](#)]
16. Knoll, J.; Gunaratna, N.; Ejeta, G. QTL analysis of early-season cold tolerance in sorghum. *Theor. Appl. Genet.* **2008**, *116*, 577–587. [[CrossRef](#)]
17. Burow, G.; Burke, J.J.; Xin, Z.; Franks, C.D. Genetic dissection of early-season cold tolerance in sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench). *Mol. Breed.* **2011**, *28*, 391–402. [[CrossRef](#)]
18. Fiedler, K.; Bekele, W.A.; Duensing, R.; Gründig, S.; Snowdon, R.; Stützel, H.; Zacharias, A.; Uptmoor, R. Genetic dissection of temperature-dependent sorghum growth during juvenile development. *Theor. Appl. Genet.* **2014**, *127*, 1935–1948. [[CrossRef](#)]
19. Fiedler, K.; Bekele, W.A.; Matschegewski, C.; Snowdon, R.; Wieckhorst, S.; Zacharias, A.; Uptmoor, R. Cold tolerance during juvenile development in sorghum: A comparative analysis by genomewide association and linkage mapping. *Plant Breed.* **2016**, *135*, 598–606. [[CrossRef](#)]
20. Parra-Londono, S.; Fiedler, K.; Kavka, M.; Samans, B.; Wieckhorst, S.; Zacharias, A.; Uptmoor, R. Genetic dissection of early-season cold tolerance in sorghum: Genome-wide association studies for seedling emergence and survival under field and controlled environment conditions. *Theor. Appl. Genet.* **2018**, *131*, 581–595. [[CrossRef](#)]
21. Upadhyaya, H.D.; Dwivedi, S.L.; Singh, S.; Sahrawat, K.L.; Singh, S.K. Genetic variation and postflowering drought effects on seed iron and zinc in ICRI SAT sorghum mini core collection. *Crop Sci.* **2016**, *56*, 374–383. [[CrossRef](#)]
22. Chopra, R.; Burow, G.; Burke, J.J.; Gladman, N.; Xin, Z. Genome-wide association analysis of seedling traits in diverse Sorghum germplasm under thermal stress. *BNC Plant Biol.* **2017**, *17*, 12. [[CrossRef](#)]
23. Quinby, J.R.; Karper, R.E. Inheritance of three genes that influence time of floral initiation and maturity date in Milo. *J. American Soc. Agro.* **1945**, *37*, 916–936. [[CrossRef](#)]
24. Quinby, J. R Fourth maturity gene locus in sorghum. *Crop Sci.* **1966**, *6*, 516–518. [[CrossRef](#)]
25. Rooney, W.L.; Aydin, S. Genetic control of a photoperiod sensitive response in *Sorghum bicolor* (L.) Moench. *Crop Sci.* **1999**, *39*, 397–400. [[CrossRef](#)]
26. Murphy, R.L.; Klein, R.R.; Morishige, D.T.; Brady, J.A.; Rooney, W.L.; Miller, F.R.; Dugas, D.V.; Klein, P.E.; Mullet, J.E. Coincident light and clock regulation of pseudoresponse regulator protein 37 (PRR37) controls photoperiodic flowering in sorghum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 16469–16474. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Klein, R.R.; Mullet, J.E.; Jordan, D.R.; Miller, F.R.; Rooney, W.L.; Menz, M.M.; Franks, C.D.; Klein, P.E. The effect of tropical sorghum conversion and inbred development on genome diversity as revealed by high-resolution genotyping. *Crop Sci.* **2008**, *48*, S12–S26. [[CrossRef](#)]
28. Klein, R.R.; Miller, F.R.; Dugas, D.V.; Brown, P.J.; Burrell, A.M.; Klein, P.E. Allelic variants in the PRR37 gene and the human-mediated dispersal and diversification of sorghum. *Theor. Appl. Genet.* **2015**, *128*, 1669–1683. [[CrossRef](#)]

29. Kirby, J.S.; Atkins, R.E. Heterotic Response for Vegetative and Mature Plant Characters in Grain Sorghum, *Sorghum bicolor* (L.) Moench. *Crop Sci.* **1968**, *8*, 335–339. [[CrossRef](#)]
30. Mace, E.S.; Singh, V.; van Oosterom, E.J.; Hammer, G.L.; Hunt, C.H.; Jordan, D.R. QTL for nodal root angle in sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench) co-locate with QTL for traits associated with drought adaption. *Theor. Appl. Genet.* **2012**, *124*, 97–109. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Sukumaran, S.; Li, X.; Zhu, C.; Bai, G.; Perumal, R.; Tuinstra, M.R.; Vara Prasad, P.V.; Mitchell, S.E.; Tesso, T.T.; Yu, J. QTL mapping for grain yield, flowering time, and stay-green traits in sorghum with genotyping-by-sequencing markers. *Crop Sci.* **2016**, *56*, 1429–1442. [[CrossRef](#)]
32. Bai, C.; Wang, C.; Wang, P.; Zhu, Z.; Cong, L.; Li, D.; Liu, Y.; Zheng, W.; Lu, X. QTL mapping of agronomically important traits in sorghum (*Sorghum bicolor* L.). *Euphytica* **2017**, *213*, 285. [[CrossRef](#)]
33. Zhao, J.; Mantilla Perez, M.B.; Hu, J.; Salas Fernandez, M.G. Genome-wide association study for nine plant architecture traits in sorghum. *The Plant Genome* **2016**, *9*. [[CrossRef](#)]
34. Quinby, J.R.; Karper, R.E. Inheritance of height in sorghum. *Agron. J.* **1954**, *46*, 211–216. [[CrossRef](#)]
35. Brown, P.J.; Paterson, H.A. *The Gene Pool of Sorghum Bicolor and its Improvement*; Springer Science+: Berlin, Germany, 2013; pp. 333–346.
36. Murray, S.C.; Sharma, A.; Rooney, W.L.; Klein, P.E.; Mullet, J.E.; Mitchell, S.E.; Kresovich, S. Genetic improvement of sorghum as a biofuel feedstock: I. QTL for stem sugar and grain nonstructural carbohydrates. *Crop Sci.* **2008**, *48*, 2165–2179. [[CrossRef](#)]
37. Zhao, Y.L.; Dolat, A.; Steinberger, Y.; Wang, X.; Osman, A.; Xie, G.H. Biomass yield and changes in chemical composition of sweet sorghum cultivars grown for biofuel. *Field Crops Res.* **2009**, *111*, 55–64. [[CrossRef](#)]
38. Burks, P.S.; Kaiser, C.M.; Hawkins, E.M.; Brown, P.J. Genomewide association for sugar yield in sweet sorghum. *Crop Sci.* **2015**, *55*, 2138–2148. [[CrossRef](#)]
39. Ritter, K.B.; Jordan, D.R.; Chapman, S.C.; Godwin, I.D.; Mace, E.S.; McIntyre, C.L. Identification of QTL for sugar-related traits in a sweet x grain sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench) recombinant inbred population. *Mol. Breed* **2008**, *22*, 367–384. [[CrossRef](#)]
40. Murray, S.C.; Sharma, A.; Rooney, W.L.; Klein, P.E.; Mullet, J.E.; Mitchell, S.E.; Kresovich, S. Genetic improvement of sorghum as a biofuel feedstock: II. QTL for stem and leaf structural carbohydrates. *Crop Sci.* **2008**, *48*, 2180–2193. [[CrossRef](#)]
41. Shiringani, A.L.; Frisch, M.; Friedt, W. Genetic mapping of QTLs for sugar-related traits in a RIL population of *Sorghum bicolor* L. Moench. *Theor. Appl. Genet.* **2010**, *121*, 323–336. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Mocoour, A.; Zhang, Y.-M.; Liu, Z.-Q.; Shen, X.; Zhang, L.-M.; Rasmussen, S.K.; Jing, H.-C. Stability and genetic control of morphological, biomass and biofuel traits under temperate maritime and continental conditions in sweet sorghum (*Sorghum bicolor*). *Theor. Appl. Genet.* **2015**, *128*, 1685–1701. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Murray, S.C.; Rooney, W.L.; Hamblin, M.T.; Mitchell, S.E.; Kresovich, S. Sweet sorghum genetic diversity and association mapping for brix and height. *Plant. Gen.* **2009**, *2*, 48–62. [[CrossRef](#)]
44. Shukla, S.; Felderhoff, T.J.; Saballos, A.; Vermerris, W. The relationship between plant height and sugar accumulation in the stems of sweet sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench). *Field Crops Res.* **2017**, *203*, 181–191. [[CrossRef](#)]
45. Stephens, J.C.; Miller, F.R.; Rosenow, D.T. Conversion of alien sorghum to early combine types. *Crop Sci.* **1967**, *7*, 396. [[CrossRef](#)]
46. Rosenow, D.T.; Dahlberg, J.A. Collection, conversion and utilization of sorghum. In *Sorghum: Origin, history, technology, and production*; Smith, C.W., Frederiksen, R.A., Eds.; John Wiley & Sons: Hoboken, NJ, USA, 2000; pp. 305–328.
47. Gabriel, K. A Study of Heterotic Relationships in Sorghum. Doctoral Dissertation, Texas A & M University, College Station, TX, USA, 2005.
48. Sattler, S.E.; Funnell-Harris, D.L.; Pedersen, J.F. Brown midrib mutations and their importance to the utilization of maize, sorghum, and pearl millet lignocellulosic tissues. *Plant. Sci.* **2010**, *178*, 229–238. [[CrossRef](#)]
49. Casa, A.M.; Pressoir, G.; Brown, P.J.; Mitchell, S.E.; Rooney, W.L.; Tuinstra, M.R.; Franks, C.D.; Kresovich, S. Community resources and strategies for association mapping in sorghum. *Crop. Sci.* **2008**, *48*, 30–40. [[CrossRef](#)]

50. Smith, P.G.; Millet, A.H. Germinating and sprouting responses of the tomato at low temperatures. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* **1964**, *84*, 480–484.
51. Piepho, H.P.; Möhring, J. Computing heritability and selection response from unbalanced plant breeding trials. *Genetics* **2007**, *177*, 1881–1888. [[CrossRef](#)]
52. De Mendiburu, F. Una Herramienta de Analisis Estadistico Para la Investigacion Agricola. Master's Thesis, Universidad Nacional de Ingenieria (UNI), Lima, Peru, 2009.
53. Bekele, W.A.; Wieckhorst, S.; Friedt, W.; Snowden, R.J. High-throughput genomics in sorghum: From whole-genome resequencing to a SNP screening array. *Plant. Biotech. J.* **2013**, *11*, 1112–1125. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Price, A.L.; Zaitlen, N.A.; Reich, D.; Patterson, N. New approaches to population stratification in genome-wide association studies. *Nat. Rev. Gen.* **2010**, *11*, 459. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Svishcheva, G.R.; Axenovich, T.I.; Belonogova, N.M.; van Duijn, C.M.; Aulchenko, Y.S. Rapid variance components-based method for whole-genome association analysis. *Nat. Gen.* **2012**, *44*, 1166. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Hatzig, S.V.; Frisch, M.; Breuer, F.; Nesi, N.; Ducournau, S.; Wagner, M.H.; Leckband, G.; Abbadi, A.; Snowden, R.J. Genome-wide association mapping unravels the genetic control of seed germination and vigor in *Brassica napus*. *Front. Plant Sci.* **2015**, *6*, 221. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Bradbury, P.J.; Zhang, Z.; Kroon, D.E.; Casstevens, T.M.; Ramdoss, Y.; Buckler, E.S. TASSEL: Software for association mapping of complex traits in diverse samples. *Bioinformatics* **2007**, *23*, 2633–2635. [[CrossRef](#)]
58. Saitou, N.; Nei, M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **1987**, *4*, 406–425. [[PubMed](#)]
59. Huson, D.H.; Richter, D.C.; Rausch, C.; DeZulian, T.; Franz, M.; Rupp, R. Dendroscope: An interactive viewer for large phylogenetic trees. *BMC Bioinform.* **2007**, *8*, 460. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. Franks, C.D.; Burow, G.B.; Burke, J.J. A comparison of US and Chinese sorghum germplasm for early season cold tolerance. *Crop. Sci.* **2006**, *46*, 1371–1376. [[CrossRef](#)]
61. Burow, G.; Xin, Z.; Franks, C.; Burke, J.; Hi, P. Genetic enhancement of cold tolerance to overcome a major limitation in sorghum. In Proceedings of the American Seed Trade Association Conference Proceedings (Vol. 1), Alexandria, VA, USA, 6–9 December 2011.
62. Brown, P.J.; Myles, S.; Kresovich, S. Genetic support for phenotype-based racial classification in sorghum. *Crop. Sci.* **2011**, *51*, 224–230. [[CrossRef](#)]
63. Morris, G.P.; Ramu, P.; Deshpande, S.P.; Hash, C.T.; Shah, T.; Upadhyaya, H.D.; Riera-Lizarazu, O.; Brown, P.J.; Acharya, C.B.; Mitchell, S.E.; et al. Population genomic and genome-wide association studies of agroclimatic traits in sorghum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, *110*, 453–458. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Ritter, K.B.; McIntyre, C.L.; Godwin, I.D.; Jordan, D.R.; Chapman, S.C. An assessment of the genetic relationship between sweet and grain sorghums, within *Sorghum bicolor* ssp. *bicolor* (L.) Moench, using AFLP markers. *Euphytica* **2007**, *157*, 161–176. [[CrossRef](#)]
65. Sleper, D.A.; Poehlman, J.M. *Breeding Field Crops*, 5th ed.; Ames (IA), Blackwell Publishing Professional: Oxford, UK, 2006.
66. Huang, L.D.; Backhouse, D. Induction of defence responses in roots and mesocotyls of sorghum seedlings by inoculation with *Fusarium thapsinum* and *F. proliferatum*, wounding and light. *J. Phytopathol.* **2005**, *153*, 522–529. [[CrossRef](#)]
67. Melkonian, J.; Yu, L.X.; Setter, T.L. Chilling responses of maize (*Zea mays* L.) seedlings: Root hydraulic conductance, abscisic acid, and stomatal conductance. *J. Exp. Bot.* **2004**, *55*, 1751–1760. [[CrossRef](#)]
68. Matsumoto, T.; Lian, H.L.; Su, W.A.; Tanaka, D.; Liu, C.W.; Iwasaki, I.; Kitagawa, Y. Role of the aquaporin PIP1 subfamily in the chilling tolerance of rice. *Plant Cell Physiol.* **2008**, *50*, 216–229. [[CrossRef](#)]
69. Hund, A.; Fracheboud, Y.; Soldati, A.; Stamp, P. Cold tolerance of maize seedlings as determined by root morphology and photosynthetic traits. *Eur. J. Agro.* **2008**, *28*, 178–185. [[CrossRef](#)]
70. Hund, A.; Reimer, R.; Stamp, P.; Walter, A. Can we improve heterosis for root growth of maize by selecting parental inbred lines with different temperature behaviour? *Phil. Trans. R. Soc. B* **2012**, *367*, 1580–1588. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
71. Wise, R.R. Chilling-enhanced photooxidation: The production, action and study of reactive oxygen species produced during chilling in the light. *Photo. Res.* **1995**, *45*, 79–97. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

72. Jompuk, C.; Fracheboud, Y.; Stamp, P.; Leipner, J. Mapping of quantitative trait loci associated with chilling tolerance in maize (*Zea mays* L.) seedlings grown under field conditions. *J. Exp. Bot.* **2005**, *56*, 1153–1163. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Ortiz, D.; Hu, J.; Salas Fernandez, M.G. Genetic architecture of photosynthesis in *Sorghum bicolor* under non-stress and cold stress conditions. *J. Exp. Bot.* **2017**, *68*, 4545–4557. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Zhang, D.; Kong, W.; Robertson, J.; Goff, V.H.; Epps, E.; Kerr, A.; Mills, G.; Cromwell, J.; Lugin, Y.; Phillips, C.; et al. Genetic analysis of inflorescence and plant height components in sorghum (*Panicoidae*) and comparative genetics with rice (*Oryzoidae*). *BMC Plant Biol.* **2015**, *15*, 107. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Brown, P.J.; Rooney, W.; Franks, C.; Kresovich, S. Efficient mapping of plant height QTL in a sorghum association population with introgressed dwarfing genes. *Genetics* **2008**, *180*, 629–637. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. Mace, E.S.; Hunt, C.H.; Jordan, D.R. Supermodels: Sorghum and maize provide mutual insight into the genetics of flowering time. *Theor. Appl. Genet.* **2013**, *126*, 1377–1395. [[CrossRef](#)]
77. Zou, G.; Zhai, G.; Feng, Q.; Yan, S.; Wang, A.; Zhao, Q.; Shao, J.; Zhang, Z.; Zou, J.; Han, B.; et al. Identification of QTLs for eight agronomically important traits using an ultra-high-density map based on SNPs generated from high-throughput sequencing in sorghum under contrasting photoperiods. *J. Exp. Bot.* **2012**, *63*, 5451–5462. [[CrossRef](#)]



© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

5 Diskussion

„*Sorghum* ist die Pflanze der Zukunft, nur ist es ungewiss wann die Zukunft eintritt...“

unbekannter Verfasser

Sorghum bicolor ist eine wichtige „Failsafe“-Kulturart, die die Menschheit in vielen Teilen und Klimazonen der Welt mit Nahrung, Viehfutter, Energie und Fasern versorgt. Sorghum erfüllt alle Voraussetzungen für ein erfolgreiches Zuchtprogramm: (I) Es existiert eine extrem große Diversität, die vor allem durch das „Germplasm Resource Information Network“ des „US Department of Agriculture“ (über 40.000 Akzessionen) zum Großteil freiverfügbar ist. (II) Das Sorghumgenom (diploid, mit 730 mb relativ klein) wurde zudem mehrfach sequenziert (Paterson et al. 2009, McCormick et al. 2018) und darüber hinaus besteht die Idee zur Schaffung eines Pan-Genoms für Sorghum (Tao et al. 2019). (III) SNP- und QTL-Datenbanken, die die Suche nach bestimmten Genomabschnitten oder Kandidatengenen extrem erleichtern, wie „SorGSD“ und der „Sorghum-QTL-Atlas“, wurden etabliert (Luo et al. 2016, Mace et al. 2019). (IV) Die Reife und die Pflanzenhöhe werden nur durch wenige Gene kontrolliert und sind dadurch leicht zu manipulieren (Quinby & Karper 1945, 1954). Diese Gegebenheit ermöglicht die Nutzung von exotischen, photoperiodisch sensitiven Akzessionen für Zuchtprogramme in den gemäßigten Zonen (Stephens et al. 1967). (V) Durch viele verschiedene cytoplasmatisch männliche Sterilitäts-Systeme ist eine effiziente Hybridzüchtung möglich (Stephens & Holland 1954, Schertz 1983).

Die Anpassung der tropischen C₄-Pflanze *Sorghum bicolor* an die gemäßigten Zonen Europas ist eine realisierbare Aufgabe, die mit dem Stand der Maizüchtung vor fast 50 Jahren vergleichbar ist. Auch beim Mais wurden Stück für Stück neue Akzessionen kollektiviert, getestet und den jeweiligen „heterotischen Pools“ zugeordnet bzw. eingekreuzt (Reif et al. 2005). Diese Vorgehensweise ist durchaus auch für Sorghum möglich (Windpassinger 2016). Insbesondere in Zeiten, in denen sich der Klimawandel auch auf die deutsche Landwirtschaft auswirkt, ist die Etablierung einer trockentoleranten Kulturart wie Sorghum sinnvoll.

Die nachfolgenden Kapitel diskutieren die Möglichkeiten der Phänotypisierung geeigneter Akzessionen und die damit verbundene Nutzbarmachung dieser Ressourcen für die Hybridzüchtung, sowie das Testen der experimentellen Hybriden, im Hinblick auf die Ergebnisse von Kapitel 3 und 4 (Schaffasz et al. 2019a, b).

5.1 Die Anpassung von Sorghum an mitteleuropäische Bedingungen schreitet voran – dem Mais dicht auf den Fersen?

„Alles Gescheite ist schon gedacht worden, man muß nur versuchen, es noch einmal zu denken“

Johann Wolfgang von Goethe

Die ersten Aufzeichnungen über *Sorghum bicolor* in Europa stammen aus dem 13. Jh. und wurden in Italien in der Piemonteser Gegend aufgezeichnet (Becker-Dillingen 1927). In den späten 1940er, 1950er und 1960er Jahren wurde in Deutschland bereits Sorghum angebaut. Prof. Dr. Eduard von Boguslawski (Direktor des Instituts für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung I, der Justus-Liebig-Universität Gießen) etablierte an der Lehr- und Versuchsstation in Groß-Gerau den Anbau von Sorghum. Die Sorte „Giessener Rote Besenhirse“ wurde auf den Ausgleichsflächen zur Grünschnittnutzung angebaut (Feld- und Zuchtbücher der Versuchsstation Groß Gerau (1948-1967)). Außerdem wurde an dieser Sorte der Einfluss von Licht, Temperatur und Niederschlag auf das Wachstum, die Entwicklung und die Ertragsbildung im Vergleich zu Mais (Sorte: „Badischer Landmais“) untersucht (Niopek 1960). Dieses Beispiel verdeutlicht, dass Sorghum auch in Mitteleuropa schon früh als Alternative zu Mais angesehen wurde. Dieser Ansatz wurde jedoch nach einiger Zeit nicht mehr weiterverfolgt. Ein Grund hierfür könnte der rasche Zuchtfortschritt bei Mais zu dieser Zeit sein, welcher Sorghum weniger interessant erscheinen ließ.

Heute ist Mais, gemessen an der jährlichen Produktion von 1,1 Mrd. t (2017), die wichtigste Kulturart der Welt (FaoStat). Obwohl Mais durch Christoph Columbus (1493) fast 300 Jahre später als Sorghum den Weg nach Europa fand, ist durch die frühe Verbreitung von Mexiko nach Nordamerika bis ins südliche Kanada (Matsuoka et al. 2002) eine bessere Adaptation an raue klimatische Bedingungen gegeben. Die Einführung von Mais in Europa fand in zwei wesentlichen Schritten statt. Die ersten eingeführten Akzessionen stammten aus der Karibik und konnten nur in den südlichen Teilen Spaniens (Andalusien) bzw. in der Mittelmeer-Region angebaut werden. Eine zweite Einfuhr von Akzessionen, diesmal aus den nördlichen Teilen des Nordamerikanischen Kontinents, erfolgte nur wenig später (Dubreuil et al. 2006). So wurden die „nördlichen *Flints*“ erstmals zwischen 1539 und 1549 in Süd-Deutschland und 1570 in Italien beschrieben. Insbesondere im 16. Jh. wurde Mais in vielen Alpentälern angebaut, was durch die warmen Winde im Herbst begünstigt wurde. Im Frühjahr herrschten dagegen oftmals kalte und raue Bedingungen vor. Diese klimatischen Bedingungen waren optimal, um Mais an die hierzulande vorherrschenden Bedingungen zu adaptieren. Diese Landsorten setzten auch den Grundstein für die moderne Mais-Hybridzüchtung, die in den 1940er Jahren begann (Peter et al. 2009). Diese frühe Adaptation an harsche Bedingungen, insbesondere in der Jugendentwicklung, ermöglicht heute eine frühere Aussaat des Mais im Vergleich zum Sorghum (Windpassinger et al. 2016). Mais wird heutzutage aufgrund seiner verbesserten Kältetoleranz sogar in Skandinavien, der nördlichen USA und Südkanada angebaut.

Im Gegensatz zum Mais, fand Sorghum den Weg nach Europa über China (Klein et al. 2015). Die ersten Aufzeichnungen belegen, dass Sorghum-Besentypen schon im 13. Jh. im Piemont angebaut wurden. Sorghum verbreitete sich im 17. Jh. von Italien aus nach Österreich-Ungarn, Kroatien und Serbien (Dahlberg et al. 2011). Von Europa aus gelangten die Sorghum-Besentypen im 18. Jh. nach Nord-Amerika (Klein et al. 2015). Entscheidender für die Etablierung von Sorghum in den USA waren allerdings Einführungen aus dem südlichen Afrika während des 19. Jahrhunderts. Mit dem „Sorghum Conversion Programm“ in den 1960er Jahren in Texas, USA (Stephens et al. 1967) wurden ca. 700 diverse exotische Linien zu photoneutralen und kurzen Linien konvertiert (Sleper & Poehlman 2006). Dies ermöglichte die Nutzung eines größeren Genpools für die Züchtung. Viele moderne Zuchtprogramme basieren auf der Arbeit des „Sorghum Conversion Programms“ (Klein et al. 2015), jedoch gingen bei der damaligen Konvertierung unbeabsichtigt wesentliche Eigenschaften, wie bspw. die Kältetoleranz, verloren (Marla et al. 2019), die nun aber wieder Beachtung finden müssen.

Die Adaption von Sorghum an Temperaturen unter 15° C bis 18° C, besonders im Jugendstadium, wurde früh verfolgt (Pinthus & Rosenblum 1961, Peacock 1982). In den USA zeigten Franks et al. (2006) und Salas-Fernandez et al. (2014), dass Genbankmaterial aus China, Korea und Russland eine gute Quelle für Kältetoleranz (im Jugendstadium) darstellt. Dieses Material wurde mit etabliertem Elite-Zuchtmaterial gekreuzt, um Genomregionen zu identifizieren, die mit diesem Merkmal assoziiert sind (Burow et al. 2011). Die Kältetoleranz bei Sorghum stellt ein komplexes Merkmal da, dass additiv vererbt wird (Singh 1985). In Mitteleuropa, wo die Kältetoleranz im Jugendstadium ebenfalls eine wichtige Rolle spielt, wurde das Merkmal vorzüglich in Zuchtmaterial für Biomasse- und *Dual-use*- Typen geprüft (Fiedler et al. 2012, 2014, 2016). Windpassinger et al. (2016) zeigte zudem, dass die Wurzelentwicklung eine entscheidende Rolle bei einer zügigen Jugendentwicklung von Sorghum spielen kann. Zudem griff Windpassinger et al. (2015) die Idee des *Dual-use* Typs wieder auf. Dieser wurde für mitteleuropäische Bedürfnisse verbessert und weiterentwickelt (verbesserte Jugendentwicklung), so dass er mit den bestehenden Maissorten bezüglich der Energiedichte konkurrieren kann (Windpassinger et al. 2015). Schaffasz et al. (2019b) untersuchte ein Diversitäts-Set von 338 Akzessionen (siehe Kapitel 4) bezüglich der Jugendentwicklung und Kältetoleranz und identifizierte einige tolerante Akzessionen, die interessant für die Züchtung sind. Die Toleranz gegenüber Kälte im reproduktiven Stadium ist bei weitem nicht so gut erforscht wie die im Jugendstadium. Besonders für eine volle Einkörnung der Rispe ist eine hohe reproduktive Stresstoleranz notwendig (Schaffasz et al. 2019a). Downes & Marshall (1971) beschrieben erstmals, dass Temperaturen unter 13 °C bei den getesteten Pflanzen eine männliche Sterilität ausgelöst haben. Singh (1985) zeigte, dass eine Variation für reproduktive Stresstoleranz besteht. Insbesondere Akzessionen aus Uganda und Äthiopien zeigten die höchste Toleranz. Auch Maulana & Tesso (2013) beobachteten bei der chinesischen Landsorte „*Shan Qui Red*“ ein hohes Maß an Toleranz. Ferner zeigt die Abbildung 5, dass eine Variation für das Merkmal im hier untersuchten Diversitäts-Set besteht.

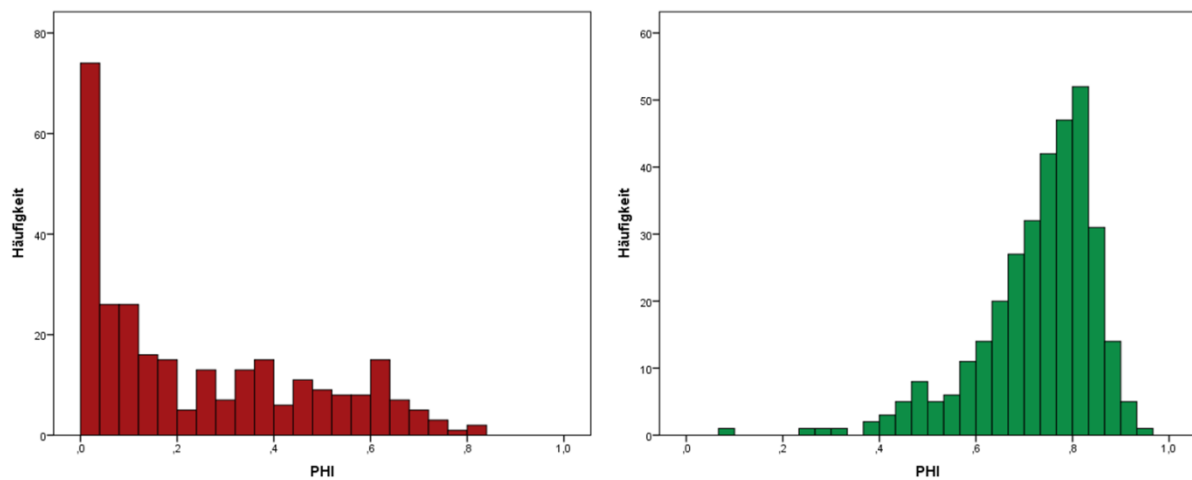


Abbildung 5. Verteilung des Merkmals *Panicle Harvest Index* in einem im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Diversitäts-Set ($n = 328$). Links wird die Verteilung für den Stress-Standort Texcoco (2017) im mexikanischen Hochland und rechts die Verteilung am Sorghum-Gunststandort Groß-Gerau (2018) gezeigt.

Abschließend kann gesagt werden, dass die nötigen Ressourcen und das nötige Wissen vorhanden sind, um Sorghum in Mitteleuropa zu einer dem Mais ebenbürtigen Kulturart zu machen. Jedoch fehlen hier aufgrund der noch geringen Marktbedeutung die dafür nötigen Investitionen und züchterischen Anstrengungen. Die wissenschaftlichen Arbeiten von Windpassinger et al. (2015, 2016) und Schaffas et al. (2019a, b) unterstreichen das bestehende Potential von Sorghum als neue sommerannuelle Kulturart.

5.2 Mechanismen hinter der Kältetoleranz

„Nun werde ich ins kalte Wasser geworfen, aber ich kann schwimmen.“

Karl-Theodor zu Guttenberg (Bundesverteidigungsminister a.D.)

Die Jugendentwicklung von Sorghum ist eines der empfindlichsten Stadien. Zahlreiche Studien identifizierten mit Kältetoleranz assoziierte Genombereiche, jedoch haben diese QTL oftmals nur einen kleinen Einfluss auf die Ausprägung des Merkmals (Schaffas et al. 2019b). Knoll et al. (2008) identifizierte Bereiche auf den Chromosomen SB-03a, SB-07b und SB-01a, die einen signifikanten Einfluss auf den Feldaufgang und die Jugendentwicklung haben. Auch Burow et al. (2011) fand QTL auf den Chromosomen SB-01, SB-02, SB-04, SB-07 und SB-09, die mit einer gesteigerten Kältetoleranz bei der Keimung, beim Feldaufgang und bei der Triebkraft einhergehen. Ferner entdeckte Bekele et al. (2014) einen vorher unbekannten QTL auf Chromosom SB-06. Parra-Londono et al. (2017) identifizierte ebenfalls ein „Haupt-QTL“ auf Chromosom SB-06 für das Merkmal finaler Feldaufgang. Des Weiteren wurden mögliche Kandidatengene vorgestellt, die die Mechanismen hinter der Kältetoleranz erklären können (Fiedler et al. 2016). Fiedler et al. (2016) identifizierte ebenfalls einige potentielle Kandidatengene, unter anderem Domänen von „Cold-shock Proteinen“.

Oftmals beinhalten mit einer Stress-Reaktion assoziierte Regionen das „*C-repeat binding factor/dehydration responsive-element binding 1 (CBF/DREB1) regulon*“ und „*cold-responsive*“ Gene (Shinozaki et al. 2003; Nakashima et al. 2009; Lata & Prasad 2011; Zhou et al. 2011; Ahmad & Prasad 2012). Darüber hinaus wurde beobachtet, dass Gene der Zellwand-Synthese des Öfteren mit abiotischem Stress assoziiert sind. Dazu zählen die Oligosaccharid-Synthese, der Stärke-Metabolismus, der transzelluläre Wassertransport und der Chlorophyll-Abbau (Bredemeijer & Esselink 1997; Javot & Maurel 2002; Maurel et al. 2008; Miura & Furumoto 2013; Corpas & Barroso 2014; Sakuraba et al. 2015). Die meisten mit Kältestress assoziierten Signalkaskaden wurden in *Arabidopsis thaliana* gefunden. Darüber hinaus wurden hoch konservierte Orthologe dieser Gene auch in Sorghum, Reis, Mais und Raps gefunden (Dubouzet et al. 2003; Qin et al. 2007; Savitch et al. 2005; Srivastav et al. 2010; Vágújfalvi et al. 2005). Des Weiteren sind Proteine der Ubiquitin-Kaskaden mit abiotischem Stress assoziiert. Diese hoch konservierten Proteine sind in der post-translationalen Modifikation involviert und stellen wichtige Regulatoren von zellulären Wachstumsprozessen dar (Lyzenga & Stone 2011). Knoll et al. (2008), Wu et al. (2012) und Maulana et al. (2017) beschrieben eine klare Assoziation zwischen Kältetoleranz im Jugendstadium und einer erhöhten Tannin-Konzentration in der Testa des Sorghumkorns. Marla et al. (2019) beschrieb ebenfalls die Kollokation von Kältestress-Toleranz-Loci mit den Tannin-Loci (*Tan1* und *Tan2*) sowie mit den Loci für Pflanzenhöhe *dw1* und *dw3*. Die Schlussfolgerung hieraus ist, dass durch die Selektion auf tanninfreie und kurze Genotypen ein Großteil der Kältetoleranz im Jugendstadium verloren ging. Trotz dieser Erkenntnisse sind weitere Studien nötig, um insbesondere das Zusammenspiel der verschiedenen Gen-Interaktionen und deren Auswirkungen auf den Metabolismus besser zu beleuchten.

Die Pollenentwicklung bei Sorghum läuft vergleichbar zu allen anderen Getreidearten ab. Dabei entwickeln sich die vier Pollensäcke synchron, das Tapetum ist ortsgebunden und wird auch als „parietales Tapetum“ bezeichnet. Die Mikrosporen-Mutter-Zellen werden bei Sorghum vom diploiden Tapetum durch eine isolierende Schicht Kallose getrennt (Lersten 2004). Die Mikrosporogense ist ein äußerst energieaufwendiger Prozess, der anfällig gegenüber verschiedensten Stressoren ist. Dazu zählt auch die Anfälligkeit gegenüber Temperaturen unter 15° C in der reproduktiven Entwicklungsphase. Im Vergleich zur Kältetoleranz im Jugendstadium bestehen für die Kältetoleranz der reproduktiven Phase weitaus weniger Studien und Erkenntnisse. Auf der Suche nach einer effizienteren Kastrationsmethode entdeckten Downes & Marshall (1971), dass Kältestress im frühen generativen Stadium eine männliche Sterilität verursachen kann. Brooking (1976) zeigte, dass die vermutlich empfindlichste Phase das frühe Leptoten während der Mikrosporogense ist. Das zeigen auch die Ergebnisse in Abbildung 6. Das frühe Leptoten stimmt ungefähr mit dem morphologischen Entwicklungsstadium überein, in dem das Fahnenblatt sichtbar bzw. voll entwickelt ist (ca. BBCH 37-39). Zudem zeigte Brooking (1979), dass die kalteinduzierte Reduktion der Pollenfertilität kein qualitativer, sondern ein gradueller bzw. quantitativer Prozess ist. Je tiefer die Temperatur fällt, desto geringer ist die Fertilität des Pollens.

Auch bei Reis (*Oryza sativa*) ist die reproduktive Kältetoleranz ein wichtiges Zuchtziel. Hierbei ist das frühe Entwicklungsstadium der Mikrosporogenese ebenfalls äußerst empfindlich (Satake & Hayase 1970). Morphologische Marker, wie bspw. die Anzahl der geplatzten Antheren pro Blüte oder die gesamte Pollenmenge am Stigma, sind wichtige Merkmale für eine Kältetoleranz (Mitchell et al. 2016) und assoziierte QTL sind beschrieben (Ye et al. 2010, Mitchell et al. 2016). Da die Mikrosporogenese ein extrem energieaufwändiger Prozess ist, muss eine optimale Versorgung des Tapetums mit Sacchariden gewährleistet sein. Oliver et al. (2005) zeigte, dass der Zuckermetabolismus im Reis eine entscheidende Rolle spielt. Bei Kältestress wird hierbei die Expression der „Antheren spezifischen Invertase“ herunter reguliert, was zu einer verminderten Ausbildung der Antheren führt (Oliver et al. 2005). So sind Antheren von kältegestressten Pflanzen meistens kleiner, blass, geschrumpft und besitzen nur eine verminderte Fähigkeit zu platzen (Subedi et al. 1998). Die „Antheren-spezifische-Invertase“ spaltet dabei das Disaccharid Saccharose (Sink) in die Monosaccharide Glucose und Fructose (Oliver et al. 2005). Die Fructose wird zu Glucose umgewandelt und diese wird als Energiespeicher zu Stärke umgewandelt. Wenn die Saccharose nicht mehr gespalten werden kann, kommt es zu einem hypertrophen Effekt (Thakur et al. 2010). Die Regulation des Zuckermetabolismus wird darüber hinaus über Phytohormone gesteuert. So zeigt Oliver et al. (2007), dass kältegestresste Reispflanzen einen hohen Gehalt an Abscisinsäure (ABA) in ihren Antheren aufweisen, welcher letztendlich zu einem Absterben des Pollens führt. Demgegenüber weisen tolerante Reispflanzen einen deutlich niedrigeren Gehalt an ABA auf (Oliver et al. 2007). Der Gehalt an bioaktiven Gibberellinen ist bei kältegestressten Pflanzen deutlich reduziert (Sakata et al. 2014).

Vermutlich sind für die Anfälligkeit bzw. Toleranz bei Sorghum ähnliche, wenn nicht sogar die gleichen Prozesse und Signalkaskaden wie bei Reis verantwortlich. Für ein besseres Verständnis der Toleranzmechanismen sollte die Verflechtung der verschiedenen Signalkaskaden von unterschiedlichen Phytohormonen (Gibberelline, ABA, Auxine, Jasmonsäure, Ethylen) sowie die Rolle von Sacchariden und Ca^{2+} besser untersucht werden.

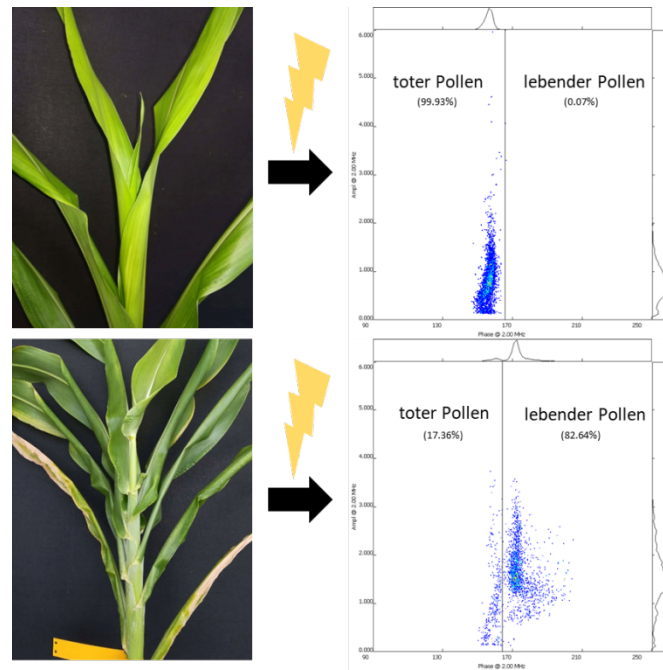


Abbildung 6. Darstellung des für *Sorghum bicolor* kritischen Stadiums bei reproduktivem Kältestress unter kontrollierten Bedingungen (25° C Tag / 7° C Nacht) an einem empfindlichen Genotyp. Das obere Bild zeigt das kritische Stadium BBCH 37, in dem bei Stress kein lebensfähiger Pollen gebildet werden kann. Das untere Bild zeigt das BBCH Stadium 43. Sorghum ist in dieser Entwicklungsphase nicht mehr anfällig gegenüber Kältestress, was die hohe Lebensfähigkeit des Pollens von über 80 % zeigt. Die Lebensfähigkeit des Pollens wurde mittels eines *Impedance Flow Cytometer* von Amphasys gemessen (für eine genauere Beschreibung des *IFC* siehe Kapitel 3 und 4.3).

5.3 Identifizierung und Prüfung von stresstoleranten Genotypen

„Hindernisse und Schwierigkeiten sind die Stufen an denen wir in die Höhe steigen“

Friedrich Nietzsche

Die Identifizierung von neuem, stresstolerantem Zuchtmaterial ist oftmals an arbeitsintensive und große Feld- und Gewächshausversuche geknüpft. Für Feldversuche ist, je nach Wahl des Ortes, der Ausgang ungewiss, da oftmals der gewünschte Stress zu früh, zu spät oder gar nicht einsetzt. Gewächshaus- oder Klimakammerversuche sind hilfreich, da hier die Versuchsbedingungen festgelegt und kontrolliert werden können. Darüber hinaus ist es bei solchen Versuchen möglich, die physiologischen und molekularen Prozesse zu erforschen. Der Platz solcher Experimente ist jedoch stark begrenzt und die Ergebnisse sind oftmals schwer mit Ergebnissen von Feldversuchen vergleichbar.

Die Keimung, der Feldaufgang und die frühe Jugendentwicklung sind Prozesse, die äußerst anfällig gegenüber Kälte sind (Pinthus & Rosenblum 1961, Peacock 1982, Yu & Tuinstra 2001, Franks et al. 2006, Windpassinger et al. 2016, Schaffasch et al. 2019b). Dabei gibt es verschiedene Merkmale die bonitiert werden können. Salas-Fernandez et al. (2014) beschreibt einen Keimungstest, bei dem das Saatgut bei 10 °C für sieben und zehn Tage ohne Licht inkubiert wird und anschließend in einem

Keimsschrank bei 20° C (16 h, Nacht), sowie 30° C (8 h, Tag) getestet wird. Der darauffolgende Entwicklungsprozess ist der Aufgang, dieser beschreibt den Übergang vom autotrophen zum heterotrophen Wachstum, wobei der junge Trieb die Erde durchbricht. Hier wird die Zeit und die Anzahl der Pflanzen zwischen Aussaat und (finale) Aufgang bonitiert bzw. gezählt (Windpassinger et al. 2016). Die Spross- und Wurzelmasse sind ebenfalls Merkmale die Rückschlüsse auf eine erhöhte Kältetoleranz geben können (siehe Kapitel 4). Da Wurzelmerkmale einen essentiellen Einfluss auf die Jugendentwicklung haben (Windpassinger et al. 2016), kann ein automatisiertes Hochdurchsatzverfahren zur Messung des Wurzelwachstums äußerst hilfreich sein (Richard et al. 2015). Im Weizen wurde solch ein System mit transparenten Töpfen erfolgreich getestet, um Unterschiede in der Wurzelarchitektur besser zu verstehen (Richard et al. 2015). Dieses System könnte auch für Sorghum verwendet werden, da es schneller und effizienter ist als herkömmliche Gel-basierte Systeme. Auch die Blattfarbe kann einen Hinweis auf eine erhöhte Kältetoleranz geben (siehe Kapitel 4). Für eine Untersuchung der Jugendentwicklung auf Genomebene, wurden bi-parentale Populationen (Bekele et al 2013), NAM und BCNAM-Populationen (Marla et al. 2019) oder auch Diversitäts-Sets verwendet (Upadhaya et al. 2016, Schaffas et al. 2019b), um mit Kältetoleranz assoziierte Regionen im Genom zu identifizieren und die zugrundeliegenden physiologischen Mechanismen besser zu verstehen. Des Weiteren wurde versucht genetische Marker zu entwickeln und diese für eine schnellere und genauere Selektion einzusetzen (Knoll & Ejeta 2008). Jedoch zeigte sich, dass die Genombereiche, auf die selektiert werden sollte, nur eine kleine Auswirkung auf die Expression einer Toleranz hatten. Zudem sind diese Marker oftmals nur in spezifischem Material einsetzbar. Ein Diversitäts-Set eignet sich, um tolerantes Material zu identifizieren. Dieses tolerante Material wird dann als Donor genutzt, indem es mit einer bestehenden Elite-Zuchtlinie (gute agronomische Eigenschaften, hohe GCA) gekreuzt und die nachfolgenden Filialgenerationen auf ihre Toleranz und agronomischen Eigenschaften geprüft werden (persönliche Mitteilung Dr. Emma Mace). Hierbei sollte idealerweise eine Pedigree Methode verwendet werden und früh auf eine bestehende Toleranz selektiert werden. Ein Einkornramsch (*Single Seed Descent*) ist dabei von Nachteil, da bei dieser Methode bis zur F₄ keine gesteuerte Selektion erfolgt.

Die reproduktive Kältetoleranz bei Sorghum ist weitaus weniger gut erforscht als die Kältetoleranz im Jugendstadium (Schaffas et al. 2019a) (siehe Kapitel 3). In den späten Sommermonaten ab August (Hauptzeit der Sorghumblüte) kann es in Deutschland und Mitteleuropa durchaus zu kühlen Nachttemperaturen kommen, was ggf. zu Ertragsminderungen durch eine schlechte Einkörnung führen kann. Auch im tropischen Hochland stellen kühle Nächte ein Problem für die Ertragsstabilität bei Sorghum dar (Singh 1985, Osuna-Ortega et al. 2000). Zur Evaluierung der reproduktiven Kältetoleranz werden die Genotypen wie bei den Methoden für die Kältetoleranz im Jugendstadium auf dem Feld sowie unter kontrollierten Bedingungen geprüft. Eine Boniturmethode ist es, den Kornerntrag pro geselbsteter Rispe oder auch das Verhältnis von tauben Blüten zu gebildeten Körnern zu bestimmen. Osuna-Ortega et al. (2000) und León-Velasco et al. (2009) bestimmten zudem

den Rispenenertrag bei offener Blüte. Dabei kann es aber zu Fremdbestäubung und somit zu einer Verfälschung des Ergebnisses kommen. Eine geeignetere Methode stellt der „Panicke Harvest Index“ (PHI) dar (Krishnamurthy et al. 2014). Die Rispe wird dabei mit einer Papier- oder Cyrovac®-Tüte eingepackt, um eine Fremdbefruchtung zu vermeiden. (siehe Abb. 7) Der PHI bildet das Verhältnis von Korntrockengewicht und Rispentrockengewicht ab (siehe Kapitel 3). Es handelt sich dabei im Vergleich zum Zählen von einzelnen Blütchen um eine schnellere Methode, die eine hohe Reproduzierbarkeit aufweist.



Abbildung 7. Kältetolerante Akzession (eingekörnte Rispe) und kälteempfindliche Akzession (wenig Körner an der Rispe) aus dem hier untersuchten Diversitäts-Set (n = 328) in Rauischholzhausen 2016.

Abbildung 5 zeigt die Verteilung von 328 diversen Genotypen, die an 6 verschiedenen Standorten in Deutschland und Mexiko getestet wurden. Repräsentativ wird hier Texcoco 2017 als Stressstandort und Groß-Gerau 2018 als Kontrollstandort gezeigt. Die Verteilung für Texcoco 2017 zeigt, dass nur wenige Genotypen einen hohen PHI und viele Genotypen einen niedrigen PHI aufweisen. Für die Umwelt in Groß-Gerau dagegen ist der PHI für den Großteil der Linien über 0,5. Des Weiteren zeigt die Abbildung, dass für das Merkmal reproduktive Kältetoleranz durchaus Variation besteht (siehe Abbildung 5 und 7). Einen geeigneten Stress- bzw. Selektionsstandort in Deutschland bzw. in Mitteleuropa zu finden, ist dagegen schwierig, da die Witterung hier äußerst variabel ist. Standorte im tropischen oder mexikanischen Hochland bieten hingegen optimale Bedingungen, um auf reproduktive Kältetoleranz zu selektieren. Am Tag herrschen dort ausreichend hohe Temperaturen (über 20° C) für

das Wachstum von Sorghum, und in der Nacht sinken die Temperaturen in der Regel auf unter 12° C. Der Pollen von ausgewählten Linien kann zusätzlich noch mittels *Impedance Flow Cytometry* (IFC) gemessen und auf seine Lebensfähigkeit und Menge überprüft werden. Diese Methode bietet im Vergleich zu herkömmlichen Färbe- bzw. mikroskopischen Methoden eine schnelle und sichere Identifizierung von toleranten Genotypen. Eine Kombination aus PHI und IFC bietet hierbei die größte Sicherheit bei der Identifizierung von Genotypen mit einer reproduktiven Kältetoleranz.

Eine weitere Methode zur Evaluierung der Toleranz von Sorghum gegenüber Stress im reproduktiven Stadium stellt eine visuelle Bonitur da. Parh et al. (2006) bonitierte die Schüttung der Pollenwolke bei einer bi-parentalen Population, um die Toleranz gegenüber *Claviceps africana* zu ermitteln. Die Schüttung des Pollens wurde dabei in zehn verschiedene Kategorien, von gar kein Pollen bis hin zu sehr viel Pollen, eingeteilt. In einer weiteren Studie wurden QTL gefunden, die mit einer Resistenz gegen *Claviceps africana* assoziiert sind (Parh et al. 2008). Ein ähnlicher Ansatz ist denkbar um die Kältetoleranz im reproduktiven Stadium zu bewerten. Eigene Versuche aus dem Jahr 2018 zeigen nur in einzelnen Fällen einen hohen Zusammenhang zwischen der bonitierten Pollenwolke und dem bonitierten Kornansatz. Beim Betrachten der Daten für alle Umwelten ist ersichtlich, dass kein Zusammenhang für die beiden Merkmale in diesem Versuch zu erkennen ist ($r = 0,03$). Im weiteren Versuchsaufbau wurde mit Hilfe eine GoPro Kamera (Modell: GoPro Hero Session 5) die Pollenwolke aufgezeichnet und mit ImageJ ausgewertet. Hierbei zeigte sich ebenfalls, dass der Versuchsaufbau Schwächen enthält, was zum einen an der verwendeten Leinwand gelegen hat und an dem auf die Morgenstunden (zwischen 09:00 – 12:00 Uhr) zeitlich begrenzten Aufnahme Fenster. Des Weiteren hatte das vorherrschende Wetter ebenfalls einen Einfluss auf die Aufnahmen. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Verwendung des PHI als Zielmerkmal für reproduktive Kältetoleranz zurzeit unerlässlich ist.

5.4 Sorghum Hybridzüchtung für Mitteleuropa

„Ich akzeptiere Scheitern, jeder scheitert mal! Doch ich kann es nicht akzeptieren es nicht zu versuchen.“ Michael Jordan

Bei Sorghum sind neben den Korn- und Biomasseerträgen auch die Reife (Kirby & Atkins 1968) und die Toleranz gegenüber abiotischem Stress, einschließlich juvenilem (Pinthus & Rosenblum 1961; Yu & Tuinstra 2001; Windpassinger et al. 2016) und reproduktivem Kältestress (Leon-Velasco et al. 2009; Schaffas et al. 2019a), als heterotische Merkmale beschrieben. Im Gegensatz zur Maishybridzüchtung sind bei Sorghum noch keine heterotischen Pools klar definiert (Jordan et al. 2003, Monk et al. 2014). Bereits vorhandene heterotische Muster können leicht durch willkürliche Kreuzungen gefährdet werden, wie dies in früheren Studien bereits beschrieben wurde (Menz et al. 2004). In diesem Zusammenhang stellt die derzeitige Verfügbarkeit kostengünstiger molekularer

Marker eine Möglichkeit dar, um von Anfang an die phylogenetische Struktur von Akzessionen in gemäßigten Sorghum-Züchtungsprogrammen zu bewerten und bei der Kreuzungsentscheidung zur Erweiterung der genetischen Diversität zu berücksichtigen. Die Entwicklung definierter heterotischer Pools könnte erheblich zur Verbesserung der abiotischen Stresstoleranz bei Sorghum-Hybriden beitragen.

Die Selektion mittels genomweiter Marker-Daten bei komplexen Merkmalen stellt im Vergleich zu den etablierten Methoden eine große Verbesserung dar (Jannink et al. 2010, Crossa et al. 2017). Studien des „International Maize and Wheat Improvement Center“ (CIMMYT) zeigten, dass die Genomische Selektion für die Züchtung neuer Hybriden vorteilhaft sein kann. So zeigten Mais-Zuchtprogramme aus Afrika, Indien und Mexiko, die Genomische Selektion nutzten, dass das Zuchtintervall um die Hälfte verkürzt werden konnte. Darüber hinaus war sowohl die Leistung der erstellten Linien, als auch die Leistung der Hybridkombinationen signifikant höher für das Merkmal Ertrag, als bei Linien und Hybriden, die ohne Anwendung der Genomischen Selektion gezüchtet worden waren (Crossa et al. 2017). Besonders der Mais kann als eine Art „Blaupause“ für Sorghum dienen, da bei dieser Kulturart viele neue Konzepte und Ideen bereits getestet worden sind. Die Vorhersage der Hybridleistung ist äußerst wichtig in der Hybridzüchtung, insbesondere im Hinblick bei der Evaluierung von vielen Inzuchtlinien in verschiedenen Kreuzungskombinationen. Schrag et al. (2009) zeigte, dass die Hybridleistung auch ohne Informationen von Testkreuzungs-Daten der elterlichen Komponenten nur anhand des Markerprofils bestimmt werden konnte. Für die Genomische Vorhersage der GCA oder die Leistung der Testkreuzungen ist nur die Information (GCA) des Testers (maternale Komponente) notwendig. Mittels der paternalen Komponente (Predictor) kann die Hybridleistung geschätzt werden (Albrecht et al. 2011, Hofheinz et al. 2012). Auch Metabolite (Riedelsheimer et al. 2012) oder mRNA Transkriptionsprofile können für die Genomische Vorhersage verwendet werden. So zeigte Zenke-Philippi et al. (2016), dass die Vorhersage der Heterosis und Hybridleistung bei Mais mittels eines „Ridge Regression“ Modells in Verbindung mit mRNA Transkriptionsprofilen das Fehlen von elterlichen Komponenten im Trainings-Set ersetzen kann. Für Sorghum bestehen bei weitem nicht so viele Studien wie beim Mais. Jedoch zeigte Bekele (2014) in seiner Dissertation eine Studie zur Genomischen Vorhersage für Pflanzenhöhe und Feldaufgang unter Kältestress. Bei diesem frühen Ansatz der Genomischen Vorhersage bei Sorghum wurde eine Vorhersage-Genauigkeit von 0,46 für das Merkmal Feldaufgang unter Kältestress festgestellt, was für einen frühen Versuch im Sorghum ein durchaus akzeptables Ergebnis darstellt. Zu berücksichtigen ist, dass die phänotypischen Daten des Feldaufgangs unter Kältestress von Jahr zu Jahr durch die Variabilität der Temperatur schwanken können und somit eine Selektion anhand des Phänotyps erschwert wird. Daher kann die Genomische Selektion für das komplexe Merkmal der Kältetoleranz bei Sorghum schneller zu einem Zuchtfortschritt führen. Speziell in Queensland (Australien) wird stetig an der Implementierung neuer Methoden in laufenden Sorghum-Zuchtprogrammen gearbeitet. Hunt et al. (2018) untersuchte für ein Sorghum „Pre-Breeding“-Programm verschiedene Modelle der

Genomischen Selektion und wie diese den Zuchtfortschritt erhöhen sowie das Zuchtintervall verkürzen können. In einem Hybrid-Zuchtprogramm ist die Identifizierung von Inzuchtlinien als maternale und paternale Komponente für die Züchtung von F₁-Hybriden mit aufwendigen Testkreuzungen verbunden, bei denen die Kombinations-Eignung evaluiert wird. Die Genomweite Vorhersage könnte hier die Anzahl der benötigten Testkreuzungen reduzieren und eine schnellere Identifizierung von geeigneten Komponenten ermöglichen, wodurch die Kosten reduziert würden (Velazco et al. 2019b). Die Zeitspanne zwischen der Kreuzung und der ersten Ertragsmessung in einem Sorghum-Zuchtprogramm kann bei der paternalen-Komponente bis zu sechs Jahre (bei Zuchtprogrammen ohne Winterzuchtgarten) und bei der maternalen Komponente bis zu acht Jahre dauern. Weitere zwei bis vier Jahre dauert es bis diese Linien als elterliche Komponenten identifiziert werden (Rizal et al. 2014). Die genomische Vorhersage verbessert dabei die Genauigkeit der Bestimmung von großen und kleinen allelischen Effekten, die über das komplette Genom verteilt sind. Solche Effekte werden anhand einer Trainings-Population gesammelt, die phänotypisiert und genotypisiert ist. Diese Daten werden anschließend verwendet um den Zuchtwert von ungetesteten, aber genotypisierten Inzuchtlinien vorherzusagen (Velazco et al. 2019b). Velazco et al. (2019b) zeigte, dass durch das Einbeziehen von Pedigree Daten in der Kinship-Matrix und Marker-basierte Verbindungen die Vorhersage-Genauigkeit für Sorghum, insbesondere für schwach heritable Merkmale wie Kornertrag oder das Merkmal „Stay-green“, erhöht werden konnte. Diese Ergebnisse zeigen, dass die genomische Selektion durchaus ein vielversprechender Ansatz für die Züchtung von kältetoleranten Sorghumhybriden ist.

Im Gegensatz zu Mais steht die Anwendung der Doppelhaploiden-Technologie bei Sorghum noch in den Startlöchern. Am Beispiel Mais zeigte sich, dass die Doppelhaploiden-Technologie das Zuchtintervall deutlich verkürzen kann und somit schnell ein hohes Maß an Homozygotie erreicht wird. Hussain & Franks (2019) identifizierten zwei Sorghum „Inducer“-Linien aus 4000 Genotypen. Dies könnte einen enormen Durchbruch in der Sorghumzüchtung darstellen und zu einer Verkürzung des Zuchtintervalls in der Sorghumzüchtung führen. Mit einer etablierten Doppelhaploiden Technologie in Sorghum könnten die Kosten durch eine Einsparung mehrerer Generationszyklen und den oftmals verwendeten Winterzuchtgarten extrem sinken. Jedoch besteht für die zwei beschriebenen „Inducer“-Linien ein Patent von Pioneer Hi-Bred International, INC., Iowa (De Long et al. 2018). Somit bleibt die Doppelhaploiden-Technologie für kleinere Zuchtprogramme womöglich noch lange eine Zukunfts-Technologie.

Die Eigenleistung der Inzuchtlinie kann für die Selektion ein wichtiges Merkmal darstellen. Windpassinger et al. (2016) zeigte jedoch, dass die Hybridleistung für abiotische Stresstoleranz nur eingeschränkt aufgrund der *per se* Leistung der Elternlinien vorhergesagt werden kann. Dennoch können verschiedene Methoden genutzt werden, um die Leistung von Hybriden anhand ihrer Eltern zu bestimmen. Einerseits besteht die Möglichkeit die Eigenleistung mit der Generellen Kombinations

Eignung (GCA) zu korrelieren, wobei dann der Korrelationskoeffizient die Güte der Vorhersage anzeigt. Andererseits kann alternativ auch das Elternmittel mit der Hybridleistung korreliert werden. Ferner zeigte Windpassinger et al. (2016), dass durch eine Züchtung, die auf effiziente GCA Tests und heterotisch divergente Pools setzt, ein Zuchtfortschritt für das komplexe Merkmal der Kältetoleranz in der Jugendentwicklung möglich ist. Insbesondere für das Merkmal Feldaufgang dominierten weibliche GCA Effekte. In diesem Fall war jedoch die Variation der getesteten Mutterlinien niedrig, so dass zur Bestätigung der Aussagen weitere Mutterlinien getestet werden müssten. Auch Schaffasz et al. (2019a) beobachtete hohe GCA-Effekte für die reproduktive Kältetoleranz. Deswegen sind nur wenige Test-Kreuzungen nötig, um tolerante Hybriden und geeignete Hybrideltern zu identifizieren (Reif et al. 2005). Auch für die reproduktive Kältetoleranz konnte eine größere Bedeutung maternaler gegenüber paternaler GCA Effekte gezeigt werden (Schaffasz et al. 2019a), was allerdings auch durch den genetischen Hintergrund der verwendeten Inzuchtlinien bedingt sein könnte. Die Züchtung neuer Mutterlinien ist jedoch aufgrund verschiedener Anforderungen und Herausforderungen zeit- und kostenintensiv. Zuerst müssen Sorghumlinien mit verbesserten Eigenschaften für die relevanten Merkmale sowie einer klimatischen Adaptation bei gleichzeitiger Maintainerreaktion identifiziert werden. Diese müssen anschließend mit einer etablierten Mutterlinie bis zur sechsten Rückkreuzungsgeneration zurückgekreuzt werden. Dabei ist die erfolgreiche Entwicklung von sterilen Mutterlinien aber oftmals unsicher, da die CMS-Stabilität nicht immer gegeben ist (Jordan et al. 2011). In CMS-basierten Zuchtprogrammen ist deswegen die genetische Variation auf Seiten der Restorer oftmals wesentlich höher (Menz et al. 2004). Der Großteil der hierzulande verwendeten Mutterlinien stammt aus den USA und basiert auf dem „*Kafir*“-Cytoplasma, welches bekanntlich eine verminderte Kältetoleranz aufweist (Marla et al. 2019). Die Entwicklung von neuen, an hiesige Bedingungen angepassten Mutterlinien ist demnach essentiell und von großer Bedeutung für die erfolgreiche Züchtung von in der abiotischen Stresstoleranz verbesserten Sorghumsorten.

Eine weitere große Herausforderung in der Züchtung von Sorghum-Hybriden für mitteleuropäische Bedingungen wird die Kombination der Toleranzen gegen Kältestress in der Jugendentwicklung und der reproduktiven Entwicklungsphase mit einer guten Ertragsleistung darstellen. Hierbei wäre gegebenenfalls auch die Etablierung von regional abhängigen Klima-Modellen sinnvoll. Beispielsweise wurden für Mais Modelle entwickelt, die phänotypische und geographische Informationen sowie historische Wetterdaten berücksichtigen, um Umwelten für Mais besser zu klassifizieren (Löffler et al. 2005). Auch in Queensland (Australien), wo terminaler Trockenstress ein Problem darstellt, haben australische Züchter den Trockenstress an nur einer Umwelt in fünf verschiedene Szenarien untergliedert. Dies machte es möglich, präzise Vorhersagemodelle zu entwickeln, die in ein Test-Programm übernommen werden konnten. Diese Vorhersage-Modelle wurden für ein Maiszucht-Programm in den USA erfolgreich getestet (Messina et al. 2015, Gaffney et al. 2015). Diese allumfassende Herangehensweise in Kombination mit Genomischer Selektion könnte

zukünftig zu einem schnelleren Zuchtfortschritt führen und die Adaptation neuer Kulturarten wie Sorghum in Mitteleuropa schneller ermöglichen.

5. 5 Fazit

Sorghum ist global gesehen die fünftwichtigste Getreideart und besticht mit einer extrem großen Anpassungsfähigkeit. Auch in Europa ist die Sorghum-Anbaufläche in der letzten Dekade gestiegen. Besonders in Zeiten des aufkommenden Klimawandels, in denen Wetterextreme auch in Mitteleuropa weiter zunehmen, stellt Sorghum als „Failsafe“-Kulturart eine Alternative zu bestehenden Kulturarten wie dem Mais dar. Dabei würde die Sommerung Sorghum die bestehenden Fruchtfolgen erweitern und zur Lösung der zunehmenden Unkrautproblematik (z. B. Herbizidresistenzen bei Ackerfuchsschwanz) beitragen. Diese Thesis zeigt, dass zusätzlich zu bereits beschriebenen Toleranzquellen weitere, hier erstmalig beschriebene Akzessionen als wertvolles Ausgangsmaterial für die Züchtung auf juvenile und reproduktive Kältetoleranz existieren. Dabei konnte eine hohe Variation für die reproduktive Kältetoleranz beobachtet werden. Diese neu identifizierten Toleranzquellen werden für ein weiterführendes Sorghum-Zuchtprogramm verwendet. Die Vererbung der reproduktiven Kältetoleranz wurde in einem aus 49 Hybriden bestehendem Factorial untersucht. Die gewonnenen Erkenntnisse zeigen, dass sowohl die mütterliche als auch die väterliche Komponente ein hohes Level an Toleranz aufweisen sollte, um Hybriden mit einer verbesserten Toleranz zu züchten. Auch das Ziel, mit einer verbesserten Kältetoleranz im Jugendstadium einer früheren Aussaat und somit einem höheren Ertragspotenzial und einer früheren Ernte näher zu kommen, wird durch die Erkenntnisse der vorliegenden Arbeit unterstützt.

Sorghum ist die Pflanze der Zukunft, jedoch besteht noch weiterer Forschungsbedarf, um diese Zukunft zu erreichen.

6 Zusammenfassung

Sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench) ist eine vielversprechende Alternative zum Mais (*Zea mays*). Obwohl Sorghum weltweit eine sehr große Anbaubedeutung aufweist und ebenfalls in vielen Ländern Europas bekannt ist, ist die Anbaubedeutung in Deutschland eher untergeordnet. Durch die diversen Nutzungsmöglichkeiten, wie Grünschnitt- und Silagenutzung ist ein Anbau in gemäßigten Regionen Europas möglich. Darüber hinaus ist Sorghum tolerant gegenüber dem Westlichen Maiswurzelbohrer (*Diabrotica virgifera*), weist eine hohe Toleranz gegenüber Trockenheit auf und verfügt über eine hohe Nährstoffnutzungs-Effizienz. Die hohe Anfälligkeit gegenüber Kälte im Jugendstadium, als auch während der frühen reproduktiven Phase sind die größten Nachteile von Sorghum. Grund hierfür ist die im Vergleich zum Mais relativ späte Adaptation an gemäßigte Regionen. Im Hochland der Ursprungsregionen existieren Sorghum Genotypen, die eine erhöhte Toleranz gegenüber Kältestress in der Jugendentwicklung, als auch im frühen reproduktiven Stadium aufweisen. Auf genomischer Ebene wurden verschiedene Bereiche gefunden, die mit einer verstärkten Kältetoleranz assoziiert sind. Der Versuch, genetische Marker zu entwickeln und für die kommerzielle Züchtung einzusetzen, ist jedoch schwierig, da das Merkmal einen starken quantitativen Charakter aufweist. Zukünftig könnte die genomische Selektion und Hochdurchsatz-Phänotypisierungs Plattformen hilfreich sein und zu einer Steigerung des Zuchtfortschritts führen.

Die Züchtung von Sorghum für die gemäßigten Regionen in Mitteleuropa benötigt frühreife und kältetolerante Genotypen. Hierfür wurde ein Diversitäts-Set von $n = 338$ Genotypen zusammengestellt, das zu etwa zwei Dritteln aus Konversions-Linien besteht. An verschiedenen Standorten in Deutschland wurde über zwei Jahre die Jugendentwicklung unter Kältestress bonitiert. Spross- und Wurzeltrockenmasse, sowie Aufgang, Aufgangs-Index und Blattfarbe wurden ausgewertet. Darüber hinaus wurden wichtige agronomische Merkmale, wie Blühbeginn, Wuchshöhe, Halmdurchmesser, Trockenmasse-Substanz und der Zuckergehalt (Brix) dokumentiert. Die Genotypen unterscheiden sich hinsichtlich der bonitierten Merkmale signifikant voneinander. Vielversprechende Akzessionen, welche eine hohe durchschnittliche Toleranz, verbunden mit einer zufriedenstellenden Toleranzstabilität (Ökovalenz) zeigen, wurden identifiziert. Eine genomweite Assoziationsstudie für die Kältestressmerkmale zeigte, wie in der bestehenden Literatur beschrieben, dass es sich um ein hoch quantitatives Merkmal handelt. So wurden in dieser Studie nur wenige schwach signifikante Marker-Merkmal-Assoziationen für die Kältestress-Merkmale gefunden. Für die untersuchten agronomischen Merkmale konnten durchaus signifikante Marker-Merkmal-Assoziationen gefunden werden. Besonders für die Wuchshöhe konnten die bekannten Genorte auf den Chromosomen SB-06, SB-07 und SB-09 bestätigt werden. Für die Trockenmasse-Substanz konnte gezeigt werden, dass diese in enger Assoziation mit dem Merkmal Blühbeginn steht. Des Weiteren zeigt die Studie, dass

Genotypen existieren, die durchaus an gemäßigte Regionen angepasst sind und eine ausgeprägte Kältetoleranz, sowie hervorragende agronomische Eigenschaften aufweisen und somit wertvolles Ausgangsmaterial für die Züchtung von Sorghum in Europa darstellen.

Die reproduktive Kältetoleranz ist für die gemäßigten Regionen Europas als auch für das tropische Hochland ein wichtiges Zuchtziel. Hierbei handelt es sich um eine, durch Kältestress induzierte, männliche Sterilität, die zu hohen Ertragsverlusten führen kann. Um dieses Merkmal besser zu verstehen, wurde ein Diversitäts-Set bestehend aus $n = 328$ diversen Akzessionen an sechs Standorten über zwei Jahre getestet. Verschiedene Korn- und Rispenmerkmale wie Korngewicht, Kornanzahl, Rispengewicht und der Panicle Harvest Index (PHI) wurden dokumentiert. Zudem wurde neueste Technologie eingesetzt, um die Pollen-Viabilität von ausgewählten „extremen“ Genotypen zu erfassen und den genauen Zeitpunkt des kritischen Stadiums besser zu bestimmen. Ausgehend von den Feldversuchen konnte gezeigt werden, dass Variation für das Merkmal reproduktive Kältetoleranz besteht. Darüber hinaus wurden neue hochtolerante Akzessionen identifiziert und für die Sorghum-Züchtung ausgewählt. Zudem wurden faktorielle Hybriden erstellt, die verschiedene Toleranzniveaus aufweisen. Diese wurden ebenfalls über zwei Jahre an den ausgewählten Standorten geprüft. Die untersuchten Merkmale Korngewicht, Kornanzahl und PHI weisen einen heterotischen Charakter auf. Für das Merkmal PHI wurden starke GCA-Effekte, vorherrschend von der mütterlichen Komponente, festgestellt. Zudem wurde in vielen Fällen eine starke mid-parent Heterosis gefunden und nur in wenigen Fällen eine better-parent Heterosis, was auf eine dominante Vererbung des Merkmals hinweist. Die vorherrschenden, starken GCA-Effekte erleichtern die Hybridzüchtung auf reproduktive Kältetoleranz. Insbesondere die Entwicklung neuer, an die gemäßigten Regionen Zentral Europas angepasster Mutter-Linien ist eine wichtige Aufgabe der Zukunft.

Sorghum bicolor stellt eine vielseitige und anspruchslose Kulturart dar, die besonders im Hinblick auf sich verändernde klimatische Bedingungen eine alternative Sommerung in Mitteleuropa und in Deutschland sein kann. Die Tatsache, dass nur wenige bis keine Pestizide eingesetzt werden müssen und der Wasserbedarf im Vergleich zu anderen Kulturarten geringer ist, steigert die Attraktivität von Sorghum.

7 Summary

Sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench) is a promising alternative to maize (*Zea mays*). Although sorghum has worldwide a high importance and is also known in many European countries, the growing importance in Germany is rather subordinate. Due to the various uses, such as green fodder and silage, cultivation in temperate regions of Europe is possible. In addition, sorghum is tolerant to the western corn rootworm (*Diabrotica virgifera*), has a high tolerance to drought and is highly nutrient efficient. The high susceptibility to cold in the juvenile stages, as well as during the early reproductive phase are the main disadvantages of sorghum. One reason for this is the relatively late adaptation to temperate regions compared to maize. In the highland regions of the originate countries exist sorghum genotypes, which have an increased tolerance at both susceptible stages. At the genomic level, various areas have been found that are associated with increased cold tolerance. However, trying to develop genetic markers and use them for commercial breeding is difficult because the trait has a strong quantitative character. In the future, genomic selection and high-throughput phenotyping platforms could be helpful and lead to an increase in breeding progress

Growing sorghum for the temperate regions in Central Europe requires early-mature and cold-tolerant genotypes. For this purpose, a diversity set of $n = 338$ genotypes was composed, which consists of about two thirds of conversion lines. At various locations in Germany, juvenile development under cold stress was rated over two years. Shoot and root dry weight, as well as emergence, emergence index and leaf color were evaluated. In addition, important agronomic traits such as the flowering time, plant height, stem diameter, dry matter substance and the sugar content (Brix) were scored. The genotypes differed significantly from each other in terms of the traits assessed. Promising genotypes combining a high average tolerance with good stability (ecovalence) could be identified. A genome-wide association study for the cold stress characteristics showed, as described in the existing literature, that it is a highly quantitative trait. For example, only a few weakly significant marker-trait associations for the cold stress traits were found in this study. For the examined agronomic traits marker-trait-associations could be found as well.. The known gene loci on the chromosomes SB-06, SB-07 and SB-09 could be confirmed especially for the height. For the dry matter substance, it could be shown that this is in close association with flowering time. This study was the first in Central Europe to test a diversity set for the features described. Furthermore, the study shows that genotypes exist that are well adapted to temperate regions and have a pronounced cold tolerance, as well as excellent agronomic properties and valuable base material for further sorghum breeding in Europe.

The reproductive cold tolerance is also an important breeding goal for the temperate regions of Europe as well as for the tropical highlands. Cold stress can induce male sterility, which can lead to high yield losses. In order to better understand this feature, a diversity set consisting of $n = 328$ diverse

accessions at 6 locations was tested at two years. Various grain and panicle characteristics such as grain weight, number of grains, panicle weight and the Panicle Harvest Index (PHI) were documented. In addition, state-of-the-art technology was used to determine the pollen viability of selected “extreme” genotypes and to better determine the exact time of the critical stage. Based on the field tests, it could be shown that there is variation for the trait reproductive cold tolerance. Furthermore, new, highly tolerant accessions were identified and selected for sorghum breeding. In addition, factorial hybrids with different tolerance levels were created, which were also tested over two years at the selected locations. The examined characteristics grain weight, number of grains and PHI have a heterotic character. Strong GCA effects based on the maternal component were found for the trait PHI. In addition, a strong mid-parent heterosis was found in many cases and only in a few cases a better-parent heterosis, which indicates a dominant inheritance of the trait. The predominant GCA effects enhance the efficiency of hybrid breeding for reproductive cold tolerance. In particular, the development of new mother lines adapted to the temperate regions of Central Europe is an important task of the future.

Sorghum bicolor represents a versatile and resilient culture that can be an alternative summer-crop in Central Europe and Germany, especially in view of the rapidly changing climatic conditions. The fact that only a few or no pesticides have to be used and the water requirement is lower in comparison to other crops increases the attractiveness of sorghum.

8 Referenzen

- Ahmad, P., & Prasad, M. N. V. (Eds.). (2011). *Environmental adaptations and stress tolerance of plants in the era of climate change*. Springer Science & Business Media.
- Albrecht, T., Wimmer, V., Auinger, H. J., Erbe, M., Knaak, C., Ouzunova, M., Simianer, H., & Schön, C. C. (2011) Genome-based prediction of testcross values in maize. *Theor Appl Genet.* 2011; 123:339–50.
- Bai, C., Wang, C., Wang, P., Zhu, Z., Cong, L., Li, D., Liu, Y., Zheng, W., & Lu, X. (2017) QTL mapping of agronomically important traits in sorghum (*Sorghum bicolor* L.). *Euphytica* 2017, 213, 285.
- Bandara, A. Y., Weerasooriya, D. K., Gobena, D. D., Hopper, D. J., Tesso, T. T., & Little, C. R. (2019). Improving sweet sorghum for enhanced juice traits and biomass. *Plant Breeding*.
- Bean, S. R., Ioerger, B. P., Wilson, J. D., Tilley, M., Rhodes, D., & Herald, T. J. (2018). Structure and chemistry of sorghum grain. In *Achieving sustainable cultivation of sorghum Volume 2* (pp. 19-46). Burleigh Dodds Science Publishing.
- Becker-Dillingen, J. (1927). *Handbuch des Getreidebaues einschließlich Mais, Hirse und Buchweizen*. Berlin, Paul Parey.
- Bekele, W. A., Wieckhorst, S., Friedt, W., & Snowdon, R.J. (2013). High-throughput genomics in sorghum: from whole-genome resequencing to a SNP screening array. *Plant Biotechnology Journal* 11 (9), 1112-1125
- Bekele, W. A. (2014). *Genomics of abiotic stress responses and adaptation in sorghum (Sorghum bicolor (L.) Moench)* (Doctoral dissertation, Universitätsbibliothek Gießen).
- Bekele, W. A., Fiedler, K., Shiringani, A., Schnaubelt, D., Windpassinger, S., Uptmoor, R., Friedt, W., & Snowdon, R. J. (2014). Unravelling the genetic complexity of sorghum seedling development under low-temperature conditions. *Plant, cell & environment*, 37(3), 707-723.
- Berenji, J., Dahlberg, J., Sikora, V., & Latkovic D (2011). Origin, history, morphology, production, improvement and utilization of broomcorn. *Economic Botany* 65 (2), 190-198.
- Bhagavatula, S., Rao, P.P., Basavaraj, G., & Nagaraj, N. (2013). *Sorghum and Millet Economies in Asia—Facts, Trends and Outlook*, International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics: Patancheru, India,
- Bhandari, A., Bartholomé, J., Cao-Hamadoun, T. V., Kumari, N., Frouin, J., Kumar, A., & Ahmadi, N. (2019). Selection of trait-specific markers and multi-environment models improve genomic predictive ability in rice. *PloS one*, 14(5), e0208871.
- Bittinger, T. S., Cantrell, R. P., & Axtell, J. D. (1981). Allelism tests of the brown-midrib mutants of sorghum. *Journal of Heredity*, 72(2), 147-148.
- Blum, A., Golan, G., Mayer, J., Sinmena, B., & Obilana, T. (1992). Comparative productivity and drought response of semi-tropical hybrids and open-pollinated varieties of sorghum. *The Journal of Agricultural Science*, 118(1), 29-36.

- Borrell, A. K., Mullet, J. E., George-Jaeggli, B., van Oosterom, E. J., Hammer, G. L., Klein, P. E., & Jordan, D. R. (2014). Drought adaptation of stay-green sorghum is associated with canopy development, leaf anatomy, root growth, and water uptake. *Journal of experimental botany*, 65(21), 6251-6263.
- Bredemeijer, G. M. M., & Esselink, G. (1997). Glucose 6-phosphate dehydrogenase during cold-hardening in *Lolium perenne*. *J Plant Physiol* 145: 565–569
- Brooking, I. R. (1976). Male sterility in *Sorghum bicolor* (L.) Moench induced by low night temperature. I. Timing of the stage of sensitivity. *Functional Plant Biology*, 3(5), 589-596.
- Brooking, I. R. (1979). Male sterility in *Sorghum bicolor* (L.) Moench induced by low night temperature. II. Genotypic differences in sensitivity. *Functional Plant Biology*, 6(2), 143-147.
- Brown, P. J., & Paterson, A. H. (2013). Bridging classical and molecular genetics of sorghum plant stature and maturity. In: Paterson AH (ed.) *Genomics of the Saccharinae* (pp. 333-345), *Plant Genetics and Genomics: Crops and Models*. New York, Springer.
- Burow, G., Burke, J. J., Xin, Z., & Franks, C. D. (2011). Genetic dissection of early-season cold tolerance in sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench). *Molecular Breeding* 28 (3), 391-402.
- Bundessortenamt, Beschreibende Sorten Liste 2019
(https://www.bundessortenamt.de/bsa/media/Files/BSL/bsl_getreide_2019.pdf) abgerufen am 13.12.2019, um 10:43 Uhr
- Bundessortenamt, Richtlinien für die Durchführung von landwirtschaftlichen Wertprüfungen und Sortenversuchen, Sorghumhirse (Silonutzung),
(https://www.bundessortenamt.de/bsa/media/Files/RILI_4_19_Sorghum_201404.), Stand April 2014, abgerufen am 14.02.2020, um 10:21 Uhr
- Chapman, S. C., Zheng, B., Potgieter, A., Guo, W., Frederic, B., Liu, S., Madec, S., Solan, B., George-Jaeggli, B., Hammer, G. L., & Jordan, D. (2018). 10 Visible, Near Infrared, and Thermal Spectral Radiance On-Board UAVs for High-Throughput Phenotyping of Plant Breeding Trials. *Biophysical and Biochemical Characterization and Plant Species Studies*, 275.
- Childs, K. L., Miller, F. R., Cordonnier-Pratt, M. M., Pratt, L. H., Morgan, P. W., & Mullet, J. E. (1997). The sorghum photoperiod sensitivity gene, Ma3, encodes a phytochrome B. *Journal of Plant Physiology* 113(2), 611-619.
- Chopra, R., Burow, G., Burke, J. J., Gladman, N., & Xin, Z. (2017). Genome-wide association analysis of seedling traits in diverse *Sorghum* germplasm under thermal stress. *BMC plant biology*, 17(1), 12.
- Christopher, J. T., Veyradier, M., Borrell, A. K., Harvey, G., Fletcher, S., & Chenu, K. (2014). Phenotyping novel stay-green traits to capture genetic variation in senescence dynamics. *Functional Plant Biology*, 41(11), 1035-1048.
- Cisneros-López, M.E., Mendoza-Onofre, L.E., Zavaleta-Mancera, H.A., González-Hernández, V.A., Mora-Aguilera, G., Córdova-Téllez, L., & Hernández-Martínez, M. (2010). Pollen–pistil interaction, pistil histology and seed production in A×B grain sorghum crosses under chilling field temperatures. *J. Agric. Sci.*, 148, 73–82.

- Clayton, W. D., & Renvoize, S. A. (1986). Genera graminum. Grasses of the world. *Genera graminum. Grasses of the World.*, 13. 338-345
- Conner, A. B., & Karper, R. E. (1927). Hybrid vigor in sorghum. Texas Agricultural Experimental Station Bulletin 359, Texas A&M University, College Station.
- Cooper, E. A., & Kresovich, S. (2018) The comparative and evolutionary genomics of sorghum, in Rooney, W. (2018). *Achieving sustainable cultivation of sorghum. Volume 1: Genetics, breeding and production techniques.* Burleigh Dodds Science Publishing Limited.
- Cooper, E. A., Brenton, Z. W., Flinn, B. S., Jenkins, J., Shu, S., Flowers, D., Luo, F., Wang, Y., Xia, P., Barry, K., Daum, C., Lipzen, A., Yoshinaga, Y., Schmutz, J., Saski, C., Vermerris, W., & Kresovich, S. (2019). A new reference genome for *Sorghum bicolor* reveals high levels of sequence similarity between sweet and grain genotypes: implications for the genetics of sugar metabolism. *BMC genomics*, 20(1), 420.
- Corpas, F. J., & Barroso, J. B. (2014). NADPH-generating dehydrogenases: their role in the mechanism of protection against nitro-oxidative stress induced by adverse environmental conditions. *Front Environ Sci.*, 2:55
- Crossa, J., Pérez-Rodríguez, P., Cuevas, J., Montesinos-López, O., Jarquín, D., de los Campos, G., Dreisigacker, S., Singh, R., Zhang, X., Gowda, M., Roorkiwal, M., Rutkoski, J., & Varshney, R. K. (2017). Genomic selection in plant breeding: methods, models, and perspectives. *Trends in plant science*, 22(11), 961-975.
- Dahlberg, J. A., & Wasylikowa, K. (1996). Image and statistical analyses of early sorghum remains (8000 BP) from the Nabta Playa archaeological site in the Western Desert, southern Egypt. *Vegetation History and Archaeobotany*, 5(4), 293-299.
- Dahlberg, J., Berenji, J., Sikora, V., & Latkovic, D. (2011). Assessing sorghum [*Sorghum bicolor* (L) Moench] germplasm for new traits: food, fuels & unique uses. *Maydica* 56 (1750), 85-92.
- Dahlberg, J. A., & Rosenow D. T. (2018). Classifying the genetic diversity of sorghum: a revised classification of sorghum, in Rooney, W. (2018). *Achieving sustainable cultivation of sorghum. Volume 1: Genetics, breeding and production techniques.* Burleigh Dodds Science Publishing Limited.
- DeLong, R., Franks, C. D., Gifford, J. M., Hunter, C. P., Hussain, T., Jaster, J. R., Mayor, M. L., & Monk, R. (2018). *U.S. Patent Application No. 15/952,472.*
- Djanaguiraman, M., Prasad, P. V., Murugan, M., Perumal, R., & Reddy, U. K. (2014). Physiological differences among sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench) genotypes under high temperature stress. *Environmental and Experimental Botany*, 100, 43-54.
- Djanaguiraman, M., Prasad, P. V. V., & Ciampitti, I. A. (2018). Growth, development and physiology of grain sorghum. In *Achieving sustainable cultivation of sorghum Volume 2* (pp. 81-102). Burleigh Dodds Science Publishing.
- Dillon, S. L., Shapter, F. M., Henry, R. J., Cordeiro, G., Izquierdo, L., & Lee, L.S. (2007). Domestication to crop improvement: Genetic resources for sorghum and saccharum (andropogoneae). *Annals of Botany* 100, 975-989.

- Deutsches Maiskomitee e. V. (DMK), Sorghum Auch in Deutschland eine Alternative? (2019)
- Deutsches Maiskomitee e. V. (DMK), <https://www.maiskomitee.de/Sorghum/Statistik> (aufgerufen am 10.03.2020 um 11:32 Uhr)
- Doggett, H. (1988). Sorghum (2nd ed.), Harlow, Longman.
- Downes, R. W., & Marshall, R. (1971). Low temperature induced male sterility in Sorghum bicolor. *Animal Production Science* 11(50), 352-356.
- Dubouzet, J. G., Sakuma, Y., Ito, Y., Kasuga, M., Dubouzet, E. G., & Miura, S. (2003). OsDREB genes in rice, *Oryza sativa* L., encode transcription activators that function in drought-, high-salt- and cold responsive gene expression. *Plant J* 33: 751–763
- Dubreuil, P., Warburton, M. L., 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(2), 281-291.
- Earp, C. F., Doherty, C. A., Fulcher, R. G., & Rooney, L. W. (1983). Beta-glucans in the caryopsis of *Sorghum bicolor* (L.) Moench. *Food microstructure*.
- FAOSTAT, <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize> (abgerufen am 26.11.2019 um 09:40 Uhr)
- Feld- und Zuchtbücher der Versuchsstation Groß-Gerau (1948-1967)
- Fernandes, S. B., Dias, K. O., Ferreira, D. F., & Brown, P. J. (2018). Efficiency of multi-trait, indirect, and trait-assisted genomic selection for improvement of biomass sorghum. *Theoretical and applied genetics*, 131(3), 747-755.
- Fiedler, K., Bekele, W. A., Friedt, W., Snowdon, R., Stützel, H., Zacharias, A., & Uptmoor, R. (2012). Genetic dissection of the temperature dependent emergence processes in sorghum using a cumulative emergence model and stability parameters. *Theoretical and Applied Genetics* 125, 1647–1661.
- Fiedler, K., Bekele, W. A., Duensing, R., Gründig, S., Snowdon, R., Stützel, H., Zacharias, A., & Uptmoor, R. (2014). Genetic dissection of temperature-dependent sorghum growth during juvenile development. *Theoretical and Applied Genetics* 127, 1935-1948.
- Fiedler, K., Bekele, W. A., Matschegewski, C., Snowdon, R., Wieckhorst, S., Zacharias, A., & Uptmoor, R. (2016). Cold tolerance during juvenile development in sorghum: a comparative analysis by genomewide association and linkage mapping. *Plant breeding*, 135(5), 598-606.
- Franks, C., Burow, G., & Burke, J. (2006). A comparison of U.S. and Chinese sorghum germplasm for early season cold tolerance. *Crop Science* 46, 1371-1376.
- Fritz, J. O., Moore, K. J., & Jaster Jr, E. H. (1990). Digestion Kinetics and Cell Wall Composition of Brown Midrib Sorghum X Sudangrass Morphological Components. *Crop Science*, 30(1), 213-219
- Food Security Department. Sorghum: Post-harvest Operations. In INPhO-Post-Harvest Compendium, Mejia, D., Lewis, B., Eds., Natural Resources Institution, University of Greenwich: London, UK, 1999, Available online: <http://www.fao.org/3/a-ax443e.pdf> (accessed on 15 December 2015).

- Gaffney, J., Schussler, J., Löffler, C., Cai, W., Paszkiewicz, S., Messina, C., Groeteke, J., Keaschall, J., & Cooper, M. (2015). Industry-scale evaluation of maize hybrids selected for increased yield in drought-stress conditions of the US Corn Belt. *Crop science*, 55(4), 1608-1618.
- Ghosal, S., Zheng, B., Chapman, S. C., Potgieter, A. B., Jordan, D. R., Wang, X., Singh, A. K., Singh, A., Hirafuji, M., Ganapathysubramanian, B., Sarkar, S., & Gut, W. (2019). A Weakly Supervised Deep Learning Framework for Sorghum Head Detection and Counting. *Plant Phenomics*, 2019, 1525874.
- Hoffmann Jr, L., & Rooney, W. L. (2013). Cytoplasm has no effect on the yield and quality of biomass sorghum hybrids. *Journal of Sustainable Bioenergy Systems*, 3(02), 129.
- Hofheinz, N., Borchardt, D., Weissleder, K., & Frisch, M. (2012). Genome-based prediction of test cross performance in two subsequent breeding cycles. *Theoretical and applied genetics*, 125(8), 1639-1645.
- House, L. R. (1985). A guide to sorghum breeding 2nd ed. *Patencheru. International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics*, 2-10.
- Hunt, C. H., van Eeuwijk, F. A., Mace, E. S., Hayes, B. J., & Jordan, D. R. (2018). Development of genomic prediction in sorghum. *Crop Science*, 58(2), 690-700
- Hussain, T., & Franks, C. (2019). Discovery of Sorghum Haploid Induction System. In *Sorghum* (pp. 49-59). Humana Press, New York, NY.
- Jannink, J. L., Lorenz, A. J., & Iwata, H. (2010). Genomic selection in plant breeding: from theory to practice. *Briefings in functional genomics*, 9(2), 166-177.
- Javot, H., & Maurel, C. (2002). The role of aquaporins in root water uptake. *Ann Bot* 90:301–313
- Jordan, D. R., Klein, R. R., Sakreowski, K. G., Henzell, R.G., Klein, P.E., & Mace, E. S. (2011b). Mapping and characterization of Rf5: a new gene conditioning pollen fertility restoration in A1 and A2 cytoplasm in sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench). *Theoretical and Applied Genetics* 123, 383-396.
- Jordan, D. R., Hunt, C. H., Cruickshank, A. W., Borrell, A. K., & Henzell, R. G. (2012). The Relationship Between the Stay-Green Trait and Grain Yield in Elite Sorghum Hybrids Grown in a Range of Environments. The Relationship Between the Stay-Green Trait and Grain Yield in Elite Sorghum Hybrids Grown in a Range of Environments. In *Crop Science* 52 (3), p.1153. DOI: 10.2135/cropsci2011.06.0326.
- Kante, M., Rattunde, H. F. W., Nèbié, B., Weltzien, E., Haussmann, B. I., & Leiser, W. L. (2018). QTL mapping and validation of fertility restoration in West African sorghum A1 cytoplasm and identification of a potential causative mutation for Rf2. *Theoretical and applied genetics*, 131(11), 2397-2412.
- Karper, R. E., & Quinby, J. R. (1947). The inheritance of callus formation and seed shedding in sorghum. *Journal of Heredity*, 38(7), 211-214.
- Kimber, C. T., Dahlberg, J.A., & Kresovich, S. (2013). The gene pool of *Sorghum bicolor* and its improvement. In: Paterson AH (ed.) *Genomics of the Saccharinae* (pp. 23-42), *Plant Genetics and Genomics: Crops and Models*. New York, Springer.
- Kirby, J. S., & Atkins, R. E. (1968). Heterotic Response for Vegetative and Mature Plant Characters in Grain Sorghum, *Sorghum bicolor* (L.) Moench. *CropScience* 8, 335-339.

- Klein, R. R., Mullet, J. E., Jordan, D. R., Miller, F. R., Rooney, W. L., Menz, M. M., Franks, C. D., & Klein, P. E. (2008). The effect of tropical sorghum conversion and inbred development on genome diversity as revealed by high-resolution genotyping. *Crop Science* 48 (S1), S12-S26.
- Klein, R. R., Miller, F. R., Dugas, D. V., Brown, P. J., Burrell, A. M., & Klein, P. E. (2015). Allelic variants in the PRR37 gene and the human-mediated dispersal and diversification of sorghum. *Theoretical and Applied Genetics* 128, 1669-1683.
- Knoll, J., Gunaratna, N., & Ejeta, G. (2008). QTL analysis of early-season cold tolerance in sorghum. *Theoretical and Applied Genetics* 116, 577-587.
- Knoll, J., & Ejeta, G. (2008). Marker-assisted selection for early-season cold tolerance in sorghum: QTL validation across populations and environments. *Theoretical and Applied Genetics* 116, 541-553.
- Kochian, L. V., Pineros, M. A., & Hoekenga, O. A. (2005). The physiology, genetics and molecular biology of plant aluminum resistance and toxicity. In *Root physiology: from gene to function* (pp. 175-195). Springer, Dordrecht.
- Krishnamurthy, L., Serraj, R., Hash, C. T., Dakheel, A. J., & Reddy, B. V. (2007). Screening sorghum genotypes for salinity tolerant biomass production. *Euphytica*, 156(1-2), 15-24.
- Krishnamurthy, L., Dinakaran, E., Kumar, A. A., & Reddy, B. V. S. (2014). Field technique and traits to assess reproductive stage cold tolerance in sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench). *Plant Production Science*, 17(3), 218-227.
- Kuriyama, T., Shimada, S., & Matsui, M. (2019). Improvement of *Agrobacterium*-mediated transformation for tannin-producing sorghum. In *Plant biotechnology (Tokyo, Japan)* 36 (1), pp. 43–48. DOI: 10.5511/plantbiotechnology.19.0131a.
- KWS Saat SE & Co. KGaA.; <https://www.kws.com/corp/en/products/sorghum/>, aufgerufen am 17.01.2020, um 09:17 Uhr
- Lata, C., & Prasad, M. (2011). Role of DREBs in regulation of abiotic stress responses in plants. *J Exp Bot.* <https://doi.org/10.1093/jxb/err210>
- León-Velasco, H., Mendoza-Onofre, L.E., Castillo-González, F., Cervantes-Santana, T., & Martínez-Garza, Á. (2009). Evaluación de dos generaciones de híbridos y progenitores de sorgo tolerantes al frío. II: Aptitude combinatoria, heterosis y heterobeltiosis. *Agrociencia* 2009, 43, 609–623.
- Lersten, N. R. (2004). Flowering plant embryology stamen and androecium. *Victoria, Australia: Wiley Blackwell.* <https://doi.org/10.1002/9780470752685>
- Liu, G., Gilding, E. K., Kerr, E. D., Schulz, B. L., Tabet, B., Hamaker, B. R., & Godwin, I. D. (2019). Increasing protein content and digestibility in sorghum grain with a synthetic biology approach. In *Journal of Cereal Science* 85, pp. 27–34. DOI: 10.1016/j.jcs.2018.11.001.
- Löffler, C. M., Wei, J., Fast, T., Gogerty, J., Langton, S., Bergman, M., Merrill, B., & Cooper, M. (2005). Classification of maize environments using crop simulation and geographic information systems. *Crop Science*, 45(5), 1708-1716.

- Lu, Y., Zhao, G., Li, Y., Fan, J., Ding, G., Zhao, J., Ni, X., Xu, Y., & Wang, W. (2013). Identification of two novel waxy alleles and development of their molecular markers in sorghum. *Genome*, 56(5), 283-288.
- Luo, H., Zhao, W., Wang, Y., Xia, Y., Wu, X., Zhang, L., Tang, B., Zhu, J., Fang L., Du, Z., Bekele, W. A., Tai, S., Jordan, D. R., Godwin, I. D., Snowden, R. J., Mace, E. S., Luo, J., & Jing, HC., (2016). SorGSD: a sorghum genome SNP database. *Biotechnology for biofuels*, 9(1), 6.
- Lyzenga, W. J., & Stone, S. L. (2011). Protein ubiquitination: an emerging theme in plant abiotic stress tolerance. *Am J Plant Sci Biotechnol*, 5, 1-11.
- Mace, E. S., Hunt, C. H., & Jordan, D. R. (2013a). Supermodels: sorghum and maize provide mutual insight into the genetics of flowering time. *Theoretical and Applied Genetics* 126, 13771395
- Mace, E., Innes, D., Hunt, C., Wang, X., Tao, Y., Baxter, J., Hassall, M., Hathorn, A., & Jordan, D. (2019). The Sorghum QTL Atlas: a powerful tool for trait dissection, comparative genomics and crop improvement. *Theoretical and Applied Genetics*, 132(3), 751-766.
- Mace, E. (persönliche Mitteilung 08.10.2019, Freising)
- Mangan, J. L. (1988). Nutritional effects of tannins in animal feeds. *Nutrition research reviews*, 1(1), 209-231.
- Mann, J. A., Kimber, C. T., & Miller, F. R. (1983). The Origin and Early Cultivation of Sorghums in Africa. *Texas FARMER Collection*.
- Marla, S. R., Burow, G., Chopra, R., Hayes, C., Olatoye, M., Felderhoff, T., Hu, Z., Raymundo, R., Perumal, R., & Morris, G. P. (2019). Genetic Architecture of Chilling Tolerance in Sorghum Dissected with a Nested Association Mapping Population. *bioRxiv*, 622894.
- Maulana, F., & Tesso, T. T. (2013). Cold temperature episode at seedling and flowering stages reduces growth and yield components in sorghum. *Crop Science*, 53(2), 564-574.
- Maulana, F., Weerasooriya, D., & Tesso, T. (2017). Sorghum landrace collections from cooler regions of the world exhibit magnificent genetic differentiation and early season cold tolerance. *Frontiers in plant science*, 8, 756.
- Maurel, C., Verdoucq, L., Luu, D. T., & Santoni, V. (2008). Plant aquaporins: membrane channels with multiple integrated functions. *Annu Rev Plant Biol* 59:595–624
- Matsuoka, Y., Vigouroux, Y., Goodman, M. M., Sanchez, G. J., Buckler, E., & Doebly, J. (2002). A single domestication for maize shown by multilocus microsatellite genotyping. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 6080-6084.
- McCormick, R. F., Truong, S. K., Sreedasyam, A., Jenkins, J., Shu, S., Sims, D., Kennedy, M., Amirebrahimi, M., Weers, B. D., McKinley, B., Mattison, A., Morishige, D. T., Grimwood, J., Schmutz, J., & Mullet J. E. (2018). The Sorghum bicolor reference genome: improved assembly, gene annotations, a transcriptome atlas, and signatures of genome organization. *The Plant Journal*, 93(2), 338-354.
- Mendoza-Onofre, L. E. (1988). Formación de híbridos de sorgo para grano. II. Comportamiento per se de las líneas y su aptitud combinatoria general. *Revis. Fitotec. Mex.* 1988, 11, 39–47.

- Menz, M. A., Klein, R. R., Unruh, N. C., Rooney, W. L., Klein, P. E., Mullet, J. E. (2004). Genetic diversity of public inbreds of sorghum determined by mapped AFLP and SSR markers. *Crop Science* 44, 1236-1244
- Messina, C. D., Sinclair, T. R., Hammer, G. L., Curan, D., Thompson, J., Oler, Z., Gho, C., & Cooper, M. (2015). Limited-transpiration trait may increase maize drought tolerance in the US Corn Belt. *Agronomy Journal*, 107(6), 1978-1986.
- Mitchell, J. H., Zulkafli, S. L., Bosse, J., Campbell, B., Snell, P., Mace, E. S., Godwin, I. D., & Fukai, S. (2016). Rice-cold tolerance across reparoductive stages. *Crop and Pasture Science*, 67(8), 823-833.
- Miura, K., & Furumoto, T. (2013). Cold signaling and cold response in plants. *International journal of molecular sciences*, 14(3), 5312-5337.
- Mocoeur, A., Zhang, Y. M., Liu, Z. Q., Shen, X., Zhang, L. M., Rasmussen, S. K., & Jing, H. C. (2015). Stability and genetic control of morphological, biomass and biofuel traits under temperate maritime and continental conditions in sweet sorghum (*Sorghum bicolor*). *Theoretical and Applied Genetics* 128, 1685-1701.
- Morris, G. P., Ramu, P., Deshpande, S. P., Hash, C. T., Shah, T., Upadhyaya, H. D., Riera-Lizarazu, O., Brown, P. J., Acharya, C. B., Mitchell, S. E., Harriman, J., Glaubitz, J. C., Buckler, E. S., & Kresovich, S. (2013). Population genomic and genome-wide association studies of agroclimatic traits in sorghum. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110, 453-458.
- Mullet, J. E., Rooney, W. L., Klein, P. E., Morishige, D., Murphy, R., & Brady, J. A. (2010). Discovery and utilization of sorghum genes (Ma5/Ma6). US Patent Application Publication (Pub. No. US 2010/0024065A1).
- Multani, D. S., Briggs, S. P., Chamberlin, M. A., Blakeslee, J. J., Murphy, A. S., & Johal, G. S. (2003). Loss of an MDR transporter in compacts talks of maize br2 and sorghum dw3 mutants. *Science* 302, 81-84.
- Mundia, C. W., Secchi, S., Akamani, K., & Wang, G. (2019). A Regional Comparison of Factors Affecting Global Sorghum Production: The Case of North America, Asia and Africa's Sahel. *Sustainability*, 11(7), 2135.
- Murphy, R. L., Klein, R. R., Morishige, D. T., Brady, J. A., Rooney, W. L., Miller, F. R., Dugas, D. V., Klein, P. E., & Mullet, J. E. (2011). Coincident light and clock regulation of pseudoresponse regulator protein 37 (PRR37) controls photoperiodic flowering in sorghum. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(39), 16469-16474
- Murray, S. C., Rooney, W. L., Hamblin, M. T., Mitchell, S. E., & Kresovich, S. (2009). Sweet sorghum genetic diversity and association mapping for brix and height. *The Plant Genome* 2, 48-62
- Nakashima, K., Ito, Y., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2009). Transcriptional regulatory networks in response to abiotic stresses in Arabidopsis and grasses. *Plant Physiol* 149:88-95
- Nelson, J. C., Wang, Shichen, Wu, Yuye, Li, Xianran, Antony, Ginny, White, Frank F., Yu, Jianming (2011). Single-nucleotide polymorphism discovery by high-throughput sequencing in sorghum. In *BMC Genomics* 12, p. 352. DOI: 10.1186/1471-2164-12-352.

- Nguyen, C. T., Singh, V., van Oosterom, E. J., Chapman, S. C., Jordan, D. R., & Hammer, G. L. (2013). Genetic variability in high temperature effects on seed-set in sorghum. *Functional Plant Biology*, 40(5), 439-448.
- Niopek, J. (1960). *Der Einfluss der Klimafaktoren Licht: Temperatur und Niederschlag auf Wachstum, Entwicklung und Ertragsbildung bei Mais und Sorgumarten*. Giessen.
- Oliver, S. N., Van Dongen, J. T., Alfred, S. C., Mamun, E. A., Zhao, X., Saini, H. S., & Dennis, E. S. (2005). Cold-induced repression of the rice anther-specific cell wall invertase gene OSINV4 is correlated with sucrose accumulation and pollen sterility. *Plant, Cell & Environment*, 28(12), 1534-1551.
- Oliver, S. N., Dennis, E. S., & Dolferus, R. (2007). ABA regulates apoplastic sugar transport and is a potential signal for cold-induced pollen sterility in rice. *Plant and Cell physiology*, 48(9), 1319-1330.
- Osuna-Ortega, J., Mendoza-Onofre, L.E., González-Hernández, V.A., Castillo-González, F., Mendoza-Castillo, M., & Williams-Alanís, H. (2000). Potential of cold tolerant germplasm in the adaptation and adaptability of sorghum in México: I. High Valleys. *Agrociencia* 2000, 34, 561-572
- Osuna-Ortega, J., Mendoza-Castillo, M. del C., & Mendoza-Onofre, L. E. (2003). Sorghum cold tolerance, pollen production and seed yield in the Central High Valleys of Mexico. *Maydica* 48, 125-132.
- Packer, D. J., & Rooney, W. L. (2014). High-parent heterosis for biomass yield in photoperiod sensitive sorghum hybrids. *Field Crops Research* 167, 153-158.
- Parh, D. K., Jordan, D. R., Aitken, E. A. B., Gogel, B. J., McIntyre, C. L., & Godwin, I. D. (2006). Genetic components of variance and the role of pollen traits in sorghum ergot resistance. *Crop science*, 46(6), 2387-2395.
- Parh, D. K., Jordan, D. R., Aitken, E. A. B., Mace, E. S., Jun-Ai, P., McIntyre, C. L., & Godwin, I. D. (2008). QTL analysis of ergot resistance in sorghum. *Theoretical and Applied Genetics*, 117(3), 369-382.
- Parra-Londono, S., Fiedler, K., Kavka, M., Samans, B., Wieckhorst, S., Zacharias, A., & Uptmoor, R. (2018). Genetic dissection of early-season cold tolerance in sorghum: genome-wide association studies for seedling emergence and survival under field and controlled environment conditions. *Theoretical and applied genetics*, 131(3), 581-595.
- Paterson, A. H., Bowers, J. E., Bruggmann, R., Dubchak, I., Grimwood, J., Gundlach, H., Haberer, G., Hellsten, U., Mitros, T., Poliakov, A., Schmutz, J., Spannagl, M., Tang, H., Wang, X., Wicker, T., Bharti, A. K., Chapman, J., Feltus, F. A., Gowik, U., Grigoriev, I. V., Lyons, E., Maher, C. A., Martis, M., Narechania, A., Otiillar, R. P., Penning, B. W., Salamov, A. A., Wang, Y., Zhang, L., Carpita, N. C., Freeling, M., Gingle, A. R., Hash, C. T., Keller, B., Klein, P., Kresovich, S., McCann, M. C., Ming, R., Peterson, D. G., Rahman, M. U., Ware, D., Westhoff, P., Mayer, K. F. X., Messing, J., & Rokhsar, D. S. (2009). The Sorghum bicolor genome and the diversification of grasses. *Nature* 457, 551-556.
- Peacock, J. M. (1982). Response and tolerance of sorghum to temperature stress. In: House, L. R., Mughogho, L. K., Peacock, J. M. (eds.) *Sorghum in the Eighties*. Proceedings of the International

- Symposium on Sorghum, Patancheru, India, November 2–7, 1981, ICRISAT, Hyderabad, India (pp143-159).
- Pedersen, J. F., Bean, S. R., Graybosch, R. A., Park, S. H., & Tilley, M. (2005). Characterization of waxy grain sorghum lines in relation to granule-bound starch synthase. *Euphytica*, 144(1-2), 151-156.
- Peter, R., Eschholz, T. W., Stamp, P., & Liedgens, M. (2009). Early growth of flint maize landraces under cool conditions. *Crop Science* 49, 169-178.
- Pfeiffer, T. W., Bitzer, M. J., Toy, J. J., Pedersen, J. F. (2010). Heterosis in sweet sorghum and selection of a new sweet sorghum hybrid for use in syrup production in Appalachia. *Crop Science* 50, 1788-1794.
- Pinthus, M. J. & Rosenblum, J. (1961). Germination and seedling emergence of sorghum at low temperatures. *Crop Science* 1, 293-296.
- Qin, F., Kakimoto, M., Sakuma, Y., Maruyama, K., Osakabe, Y., & Tran, L. S. (2007). Regulation and functional analysis of ZmDREB2A in response to drought and heat stresses in *Zea mays* L. *Plant J* 50: 54–69
- Quinby, J. R. & Karper, R. E. (1945). Inheritance of three genes that influence time of floral initiation and maturity date in Milo. *Journal of the American Society of Agronomy* 37, 916-936.
- Quinby, J. R. & Karper, R. E. (1954). Inheritance of height in sorghum. *Agronomy Journal* 46, 211-216.
- Quinby, J. R. (1966). Fourth maturity gene locus in sorghum. *Crop Science* 6, 516-518.
- Quinby, J. R. (1975). The Genetics of Sorghum Improvement, *The Journal of Heredity* 66:56-62.
- Reddy, B. V. S., Kumar, A. A., Ramesh, S., & Reedy, P. S. (2011). Sorghum genetic enhancement for climate change adaptation. In: Yadav, S. S., Redden, R., Hatfield, J. L., Lotze-Campen, H., & Hall, A. J. W. (eds.) *Crop adaptation to climate change*, 1st edn. Oxford (UK), Wiley-Blackwell.
- Reif, J. C., Hallauer, A. R., & Melchinger, A. E. (2005). Heterosis and heterotic patterns in maize. *Maydica* 50, 213-223.
- Riedelsheimer, C., Czedik-Eysenberg, A., Grieder, C., Lisec, J., Technow, F., Sulpice, R., Altmann, T., Stitt, M., & Melchinger, A. E. (2012). Genomic and metabolic prediction of complex heterotic traits in hybrid maize. *Nature genetics*, 44(2), 217.
- Richard, C. A., Hickey, L. T., Fletcher, S., Jennings, R., Chenu, K., & Christopher, J. T. (2015). High-throughput phenotyping of seminal root traits in wheat. *Plant Methods*, 11(1), 13.
- Rizal, G., Karki, S., Alcasid, M., Montecillo, F., Acebron, K., Larazo, N., Garcia, R., Slamet-Loedin, I. H., & Quick, W. P. (2014). Shortening the breeding cycle of sorghum, a model crop for research. *Crop Science*, 54(2), 520-529.
- Rooney, L. W., & Miller, F. R. (1982). Proc. Int. Symp. on Sorghum Grain Quality.
- Rooney, W. L. & Aydin, S. (1999). Genetic control of a photoperiod sensitive response in Sorghum bicolor (L.) Moench. *Crop Science* 39, 397-400.

- Rosenow, D. T., Quisenberry, J. E., Wendt, C. W., & Clark, L. E. (1983). Drought tolerant sorghum and cotton germplasm. In *Developments in agricultural and managed forest ecology* (Vol. 12, pp. 207-222). Elsevier.
- Ross, W. M., Gorz, H. J., Haskins, F. A., & Kofoed, K. D. (1979). Combining ability in forage sorghum hybrids. *Maydica* 24, 83-9
- Ruskin, F. R. (1996) Board on Science, & Technology for International Development (Eds.). (1996). *Lost Crops of Africa: Volume I: Grains* (Vol. 1). National Academy Press.
- Sakata, T., Oda, S., Tsunaga, Y., Shomura, H., Kawagishi-Kobayashi, M., Aya, K., Saeki, K., Endo, T., Nagano, K., Kojima, M., Sakakibara, H., Watanabe, M., Masuoka, M., & Higashitani, A. (2014). Reduction of gibberellin by low temperature disrupts pollen development in rice. *Plant physiology*, 164(4), 2011-2019.
- Sakuraba, Y., Park, S.Y., & Paek, N. C. (2015). The divergent roles of STAYGREEN (SGR) homologs in chlorophyll degradation. *Mol Cells* 38:390–395
- Salas-Fernandez, M. G., Schoenbaum, G. R., & Goggi, A. S. (2014). Novel germplasm and screening methods for early cold tolerance in sorghum. *Crop Science* 54, 2631-2638.
- Sanchez, A. C., Subudhi, P. K., Rosenow, D. T., & Nguyen, H. T. (2002). Mapping QTLs associated with drought resistance in sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench). *Plant molecular biology*, 48(5-6), 713-726.
- Satake, T., & Hayase, H. (1970). Male sterility caused by cooling treatment at the young microspore stage in rice plants: V. Estimations of pollen developmental stage and the most sensitive stage to coolness. *Japanese journal of crop science*, 39(4), 468-473.
- Sattler, S. E., Singh, J., Haas, E. J., Guo, L., Sarath, G., & Pedersen, J. F. (2009). Two distinct waxy alleles impact the granule-bound starch synthase in sorghum. *Molecular breeding*, 24(4), 349.
- Savitch, L., Allard, G., Seki, M., Robert, L. S., Tinker, N. A., Huner, N. P. A., Shinozaki, K., & Singh, J. (2005). The effect of overexpression of two Brassica CBF/DREB1-like transcription factors on photosynthetic capacity and freezing tolerance in Brassica napus. *Plant Cell Physiol* 46:1525–1539
- Schaffasz, A., Windpassinger, S., Snowdon, R., & Wittkop, B. (2019a). Reproductive Cold Stress Tolerance in Sorghum F1 Hybrids is a Heterotic Trait. *Agronomy*, 9(9), 508.
- Schaffasz, A., Windpassinger, S., Friedt, W., Snowdon, R., & Wittkop, B. (2019b). Sorghum as a Novel Crop for Central Europe: Using a Broad Diversity Set to Dissect Temperate-Adaptation. *Agronomy*, 9(9), 535.
- Schertz, K. F. (1983). Potentials with new cytoplasmic male sterility systems in sorghum. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 38, 1-10.
- Schnable, P. S., & Springer, N. M. (2013). Progress toward understanding heterosis in crop plants. *Annual review of plant biology*, 64, 71-88.
- Schrag, T. A., Möhring, J., Maurer, H. P., Dhillon, B. S., Melchinger, A. E., Piepho, H. P., Sorensen, A. P., & Frisch, M. (2009). Molecular marker-based prediction of hybrid performance in maize using

unbalanced data from multiple experiments with factorial crosses. *Theoretical and applied genetics*, 118(4), 741-751.

Serna-Saldivar, S.O. & Rooney, L.W. (1995). Structure and chemistry of sorghum and millets, in *Sorghum and Millets: Chemistry and Technology* (ed. D.A.V. Dendy), American Association of Cereal Chemists, St. Paul, MN, pp. 69–124.

Shapter, F. M., Crowther, A., Fox, G., Godwin, I. D., & Watson-Fox, L. (2018). The domestication, spread and uses of sorghum as a crop of Queensland, Australia, IJC Hannah, AGR Industries, Australia, and. In *Achieving sustainable cultivation of sorghum Volume 2* (pp. 47-80). Burleigh Dodds Science Publishing.

Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., & Seki, M. (2003). Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses. *Curr Opin Plant Biol* 6:410–417

Shiringani, A. L., Frisch, M., Friedt, W. (2010). Genetic mapping of QTLs for sugar-related traits in a RIL population of *Sorghum bicolor* L. Moench. *Theoretical and Applied Genetics* 121, 323-336

Singh, S. P. (1985). Sources of cold tolerance in grain sorghum. *Canadian journal of plant science*, 65(2), 251-257.

Sleper, D. A., & Poehlman, J. M. (2006). *Breeding Field Crops*. 5th ed. Ames (IA), Blackwell Publishing Professional.

Smith, C.W. and Frederiksen, R.A. (2000). *Sorghum- origin, history, technology and production*. New York, John Wiley & Sons, Inc.

Sorghum ID, <https://www.sorghum-id.com/de/accueil/> (abgerufen am 26.11.2019, um 10:20 Uhr)

Srinivasa, R. P., Reddy, B. V. S., Nagaraj, N., & Upadhyaya, H. D. (2014). Sorghum production for diversified uses. In: Wang, Y-H., Upadhyaya, H. D., & Kole, C. (eds.). *Genetics, genomics and breeding of sorghum* (pp1-27). Boca Raton (FL), Taylor & Francis.

Srivastav, A., Mehta, S., Lindlof, A., & Bhargava, S. (2010). Over-represented promoter motifs in abiotic stress-induced DREB genes of rice and sorghum and their probable role in regulation of gene expression. *Plant Signal Behav* 5(7):775–784

Staggenborg, S., & Shen, H. (2018). Sorghum as a forage and energy crop. In *Achieving sustainable cultivation of sorghum Volume 2* (pp. 127-152). Burleigh Dodds Science Publishing.

Stemler, A. B., Harlan, J. R., & Dewet, J. M. (1975). Caudatum sorghums and speakers of Chari-Nile languages in Africa. *The Journal of African History*, 16(2), 161-183.

Stephens, J. C., & Holland, R. F. (1954). Cytoplasmic male sterility for hybrid sorghum seed production. *Agronomy Journal* 46, 20-23.

Stephens, J. C., Miller, F. R., & Rosenow, D. T. (1967). Conversion of alien sorghum to early combine types. *CropScience* 7, 396.

Stoecker, B. J., & Abegaz, K. (2018). Sorghum as a food grain. In *Achieving sustainable cultivation of sorghum. Volume 2: Sorghum utilization around the world*. Burleigh Dodds Science Publishing Limited.

- Subedi, K. D., Gregory, P. J., Summerfield, R. J., & Gooding, M. J. (1998). Cold temperatures and boron deficiency caused grain set failure in spring wheat (*Triticum aestivum* L.). *Field Crops Research*, 57(3), 277-288.
- Sukumaran, S., Li, X., Zhu, C., Bai, G., Perumal, R., Tuinstra, M.R., Vara Prasad, P.V., Mitchell, S.E., Tesso, T.T., Yu, J. (2016). QTL mapping for grain yield, flowering time, and stay-green traits in sorghum with genotyping-by-sequencing markers. *Crop Sci.*, 56, 1429–1442.
- Tao, Y., Jordan, D. R., & Mace, E. S. (2019). Crop Genomics Goes Beyond a Single Reference Genome. *Trends in plant science*, 24(12), 1072-1074.
- Tari, I., Laskay, G., Takacs, Z., & Poor, P. (2013). Response of sorghum to abiotic stresses: A Review. *Journal of Agronomy and Crop Science* 199, 264-274.
- Tatum, L. A. (1971). The southern corn leaf blight epidemic. *Science*, 171(3976), 1113-1116.
- Taylor, J. R., & Belton, P. S. (2002). Sorghum. In *Pseudocereals and less common cereals* (pp. 25-91). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Taylor, J. R., Schober, T. J., & Bean, S. R. (2006). Novel food and non-food uses for sorghum and millets. *Journal of cereal science*, 44(3), 252-271.
- Taylor, J. R., Belton, P. S., Beta, T., & Duodu, K. G. (2014). Increasing the utilisation of sorghum, millets and pseudocereals: Developments in the science of their phenolic phytochemicals, biofortification and protein functionality. *Journal of Cereal Science*, 59(3), 257-275.
- Taylor, J. R. N., & Taylor, J. (2017). Proteins From Sorghum and Millets. In *Sustainable Protein Sources* (pp. 79-104). Academic Press.
- Thakur, P., Kumar, S., Malik, J. A., Berger, J. D., & Nayyar, H. (2010). Cold stress effects on reproductive development in grain crops: an overview. *Environmental and Experimental Botany*, 67(3), 429-443.
- Trachsel, S., Dhliwayo, T., Perez, L. G., Lugo, J. A. M., & Trachsel, M. (2019). Estimation of physiological genomic estimated breeding values (PGEVBV) combining full hyperspectral and marker data across environments for grain yield under combined heat and drought stress in tropical maize (*Zea mays* L.). *PloS one*, 14(3), e0212200.
- Upadhyaya, H. D., Dwivedi, S. L., Singh, S., Sahrawat, K. L., & Singh, S. K. (2016). Genetic variation and postflowering drought effects on seed iron and zinc in ICRISAT sorghum mini core collection. *Crop Science*, 56(1), 374-383.
- Vágújfalvi, A., Aprile, A., Miller, A., Dubcovsky, J., Delugu, G., Galiba, G., & Cattivelli, L. (2005). The expression of several Cbf genes at the FrA2 locus is linked to frost resistance in wheat. *Mol Genet Genom* 274:506–514
- Varshney, R. K., Terauchi, R., & McCouch, S. R. (2014). Harvesting the promising fruits of genomics: applying genome sequencing technologies to crop breeding. In *PLOS Biology* 12 (6), e1001883. DOI: 10.1371/journal.pbio.1001883.

- Velazco, J. G., Jordan, D. R., Mace, E. S., Hunt, C. H., Malosetti, M., & Van Eeuwijk, F. A. (2019a). Genomic prediction of grain yield and drought-adaptation capacity in sorghum is enhanced by multi-trait analysis. *Frontiers in plant science*, 10.
- Velazco, J. G., Malosetti, M., Hunt, C. H., Mace, E. S., Jordan, D. R., & Van Eeuwijk, F. A. (2019b). Combining pedigree and genomic information to improve prediction quality: an example in sorghum. *Theoretical and Applied Genetics*, 132(7), 2055-2067.
- Walton, C. F., Ventre, E. K., & Byall, S. (1938). *Farm production of sorgo sirup* (No. 1791). US Department of Agriculture.
- Watanabe, K., Guo, W., Arai, K., Takanashi, H., Kajiya-Kanegae, H., Kobayashi, M., Yano, K., Tokunaga, T., Fujiwara, T., Tsutsumi, N., & Iwata, H. (2017). High-throughput phenotyping of sorghum plant height using an unmanned aerial vehicle and its application to genomic prediction modeling. *Frontiers in plant science*, 8, 421.
- Windpassinger, S., Friedt, W., Frauen, M., Snowdon, R., & Wittkop, B. (2015). Designing adapted sorghum silage types with an enhanced energy density for biogas generation in temperate Europe. *Biomass and Bioenergy*, 81, 496-504.
- Windpassinger, S., Friedt, W., Deppé, I., Werner, C., Snowdon, R., & Wittkop, B. (2016). Towards Enhancement of Early-Stage Chilling Tolerance and Root Development in Sorghum F1 Hybrids. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 203(2), 146-160.
- Windpassinger, S. M. (2016). Breeding strategies for the adaptation of sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench) as a novel crop for temperate Europe.
- Wu, X., Staggenborg, S., Propheter, J. L., Rooney, W. L., Yu, J., & Wang, D. (2010). Features of sweet sorghum juice and their performance in ethanol fermentation. *Industrial crops and products*, 31(1), 164-170.
- Wu, Y., Li, X., Xiang, W., Zhu, C., Lin, Z., Wu, Y., Li, J., Pandravada, S., Ridder, D. D., Bai, G., Wang, M. L., Trick, H. N., Bean, S. R., Tuinstra, M. R., Tesso, T. T., & Yu, J. (2012). Presence of tannins in sorghum grains is conditioned by different natural alleles of Tannin1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(26), 10281-10286.
- Yang, D. Q., Luo, Y. L., Dong, W. H., Yin, Y. P., Li, Y., & Wang, Z. L. (2018). Response of photosystem II performance and antioxidant enzyme activities in stay-green wheat to cytokinin. *Photosynthetica*, 56(2), 567-577.
- Ye, C., Fukai, S., Godwin, I. D., Koh, H., Reinke, R., Zhou, Y., Lambrides, C., Jiang, W., Snell, P., & Redona, E. (2010). A QTL controlling low temperature induced spikelet sterility at booting stage in rice. *Euphytica*, 176(3), 291-301.
- Yellisetty, V., Reddy, L. A., & Mandapaka, M. (2015). In planta transformation of sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) using TPS1 gene for enhancing tolerance to abiotic stresses. In *Journal of genetics* 94 (3), pp. 425–434. DOI: 10.1007/s12041-015-0540-y.
- Yu, J. & Tuinstra, M. R. (2001). Genetic analysis of seedling growth under cold temperature stress in grain sorghum. *CropScience* 41, 1438-1443.

- Yuan, Y., Scheben, A., Batley, J., & Edwards, D. (2019). Using Genomics to Adapt Crops to Climate. *Sustainable Solutions for Food Security: Combating Climate Change by Adaptation*, 91.
- Zenke-Philippi, C., Thiemann, A., Seifert, F., Schrag, T., Melchinger, A. E., Scholten, S., & Frisch, M. (2016). Prediction of hybrid performance in maize with a ridge regression model employed to DNA markers and mRNA transcription profiles. *BMC genomics*, 17(1), 262.
- Zhao, J., Mantilla Perez, M.B., Hu, J., & Salas Fernandez, M.G. (2016). Genome-wide association study for nine plant architecture traits in sorghum. *The Plant Genome* 2016, 9.
- Zhou, M. Q., Shen, C., Wu, L. H., Tang, K. X., & Lin, J. (2011). CBF-dependent signaling pathway: a key responder to low temperature stress in plants. *Crit Rev Biotechnol* 31:186–192

Erklärung gemäß der Promotionsordnung des Fachbereichs 09 vom 07. Juli 2004 § 17 (2)

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe.

Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht.

Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

10 Danksagung

Herrn Prof. Dr. Rod Snowdon möchte ich für die Überlassung des sehr spannenden Themas und die Übernahme des ersten Gutachtens danken. Besonders danke ich für die sehr gute fachliche und kollegiale Betreuung während meiner Doktorandenzeit. Darüber hinaus möchte ich mich für die internationale Atmosphäre am Institut und für die Möglichkeit bedanken, Konferenzen zu besuchen, auch wenn diese in Südafrika waren.

Herrn Prof. Dr. M. Frisch danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens dieser Arbeit.

Herrn Dr. S. Windpassinger gilt mein spezieller Dank. Von Anfang an teilte er sein Wissen mit mir. Insbesondere für seine kompetente, wissenschaftliche und nicht zuletzt freundschaftliche Betreuung und Unterstützung bei Planung, Durchführung, Diskussion und Durchsicht der Versuche, Publikationen und dieser Arbeit. Vielen Dank auch für die lehrreichen und interessanten Reisen, insbesondere nach Mexiko, wo wir gemeinsam das SoNaBi-Div.-Set in Texcoco und San Juan del Rio besichtigten.

Auch Herrn Dr. B. Wittkop gilt mein Dank für seine kompetente und freundschaftliche Betreuung. Er unterstützte mich stets auch dabei, über den Tellerrand hinaus zu blicken. Dies ermöglichte mir, mich frei zu entfalten und mich stets weiter zu entwickeln.

Für die Durchführung der Feldversuche und die züchterische Unterstützung danke ich vor allem Mario Tolksdorf, der immer ein offenes Ohr für meine Anliegen hatte und mir mit zahlreichen Tipps und Tricks zur Seite stand. Darüber hinaus möchte ich auch Herrn Karl-Heinz Balzer danken. Auch allen anderen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Feldversuchsstationen Groß-Gerau, in Rauschholzhausen und Gießen sei hiermit gedankt.

Auch Frau Dörte Schweneker von der DSV und Frau Bärbel Frenz von der NPZ möchte ich für die gute Durchführung der Versuche an den Standorten Asendorf und Malchow danken. Sowie Herrn Manuel Velazquez Almaraz für die Durchführung der Feldversuche in Mexiko.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Sabine Frei, Annette Plank, Birgit Keiner, Svetlana Renner und Stavros Tzigos für die tatkräftige technische Unterstützung bei der Durchführung der unterschiedlichen Laborarbeiten.

Meinen Bürokollegen Isabelle Deppé, Timm Bernhard und Iulian Gabur danke ich für die gute und freundschaftliche Arbeitsatmosphäre während und nach der Arbeitszeit.

Weiterhin danke ich allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Professur für Pflanzenzüchtung für die gute Zusammenarbeit und die stets lustigen und aufregenden Zeiten während den unterschiedlichsten Situationen meiner Doktorandenzeit.

Vor allem möchte ich meiner Lebensgefährtin Marion und meinen Eltern Susanne und Waldemar herzlich für ihre Liebe und Unterstützung in allen Lebenslagen danken, die dadurch ebenso zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

Anhang

Publikation I

Table S1: Genotypic variances (mean squares) of the scored traits separately for each field environment.

Stress environments											
Asendorf (AS)				Poel 2017 (PO17)				Texcoco (TX)			
Item	d.f.	seed yield per panicle	Seed number	PHI	d.f.	seed yield per panicle	Seed number	PHI	d.f.	seed yield per panicle	Seed number
Entries	52	598.18 ***	1303809.42***	0.39	52	1153.3 7***	2311815.11***	0.26	1	851.56 ***	992407.4 6***
Error	19	21.72	50896.65	0.01	18	60.59	109468.75	0.01	45	73.37	88087.54
	3				0						
Lines	13	87.79* **	311651.7 5***	0.28** *	12	331.08 ***	713971.6 2***	0.23 ***	10	201.00 ***	234075.4 8***
Error	51	7.80	29703.46	0.01	48	12.55	42293.48	0.01	33	32.71	43190.05
Males	6	107.89 ***	254547.6 1***	0.32** *	6	423.64 ***	986538.1 8***	0.22 ***	6	282.00 ***	337690.8 5***
Error	25	10.22	26203.91	0.01	27	15.89	38546.15	0.00	24	29.38	41069.18
Females	6	55.23* **	386918.3 8***	0.15** *	5	86.80* **	383270.4 5***	0.16 ***	6	73.36* *	155056.7 8***
Error	26	5.47	33068.41	0.01	21	8.26	47111.48	0.01	23	16.30	20321.27
F vs. M	1	162.58 **	202676.7 3	0.86** *	1	997.04 ***	732078.1 2*	0.58 ***	1	157.66	79763.07
Hybrids (H)	38	731.27 ***	1600795.71***	0.42** *	39	1274.9 7***	2658379.90***	0.27 ***	34	981.66 ***	1146990.87***

Control environments											
Gross-Gerau (GG)				Poel 2018 (PO18)				San Juan del Rio (SJ)			
Item	d.f.	seed yield per panicle	Seednum ber	PHI	d.f.	seed yield per panicle	Seed number	PHI	d.f.	seed yield per panicle	Seed number
Entries	60	1585.6 0***	1768866.4 21***	0.26	60	1343.8 6***	1809251.99***	0.02	51	2811.84 ***	2440838.35***
Error	23	208.91	237019.39	0.05	24	163.06	224763.25	0.00	18	166.03	171982.80
	1				1				9		
Lines	13	955.62 ***	1414720.97***	0.15	13	890.72 ***	1383975.47***	0.06 ***	13	666.31* **	886377.89***
Error	55	155.08	195694.51	0.02	55	105.78	275340.16	0.01	53	50.13	79602.04
Males	6	1387.0 3	1845646.87	0.01	6	582.29 ***	763752.6 0***	0.08 ***	6	949.13* **	1036446.72***
Error	27	221.96	274405.38	0.04	27	43.11	58155.57	0.01	27	52.62	78200.61
Females	6	682.11 ***	1160722.51***	0.01	6	950.51 **	1388452.11**	0.05 ***	6	494.51* **	865580.60***
Error	28	90.59	119794.74	0.01	28	166.20	484768.16	0.00	26	47.53	81057.37
F vs. M	1	8.25	353156.28	0.01	1	2382.5 2**	5078452.94**	0.00	1	0.16	110748.64
Hybrids (H)	46	1654.5 9***	1875964.65***	0.02	46	1297.9 4***	1693734.83	0.00 ***	37	2937.17 ***	2594959.76***

GCA (F)	6	1579.3 8***	3710920. 39***	1.27** *	6	1922.7 7***	5249190. 61***	0.96 ***	6	1645.4 7***	2940254. 80***	0.73* ***	6	6705.8 0***	7867588. 76***	0.14 ***	6	1512.1 ***	3172417. 58***	0.01 8***	6	9203.15 ***	9677965 .78***	0.35 ***
		1675.7 6***	3393968. 46***	0.51** *	6	3114.5 9***	5242477. 07***	0.17 ***	6	1431.9 0***	907895.3 8***	0.16* **	6	2427.6 3***	1223338. 36***	.012 .	6	1816.1 8***	1855030. 84***	0.00 34**	6	1776.14 ***	761579. 43***	0.02 *
GCA (M)	6				6				6				6				6				6			
		144.19 ***	355148.9 1***	0.11** *	27	483.25 ***	927608.8 5***	0.09 ***	22	359.49 ***	402292.2 2***	0.07* **	34	648.26 ***	913725.8 7***	0.01 3***	6	1140.1 ***	1345546. 04***	0.00 46**	25	1109.99 ***	815861. 52***	0.03 ***
SCA (F x M)	26	26.72	58508.29	0.01	13	78.06	133896.1	0.01		88.11	104369.0	0.01	17	225.73	249933.4	.006	18	180.00	209807.7	0.00	13	211.20	207984.	0.01
	14				2								6				6				6			
Error	2	2175.5	2916380.	0.538*	1	6278.6	7969909.	0.37		2933.8	3319891.	0.076	1	6602.1	1434106.	0.05		9347.1	12651636	0.13	1	26066.8	1694633	0.00
L vs. H	1	1***	37**		1	9***	80***	*	1	8**	29**		1	2***	.02	*	1	3***	.32***	4***	1	4***	2.3***	

Table S2: Heterosis, GCA prediction accuracy and Pearson’s correlation between line *per se* and hybrid performance separately for each field environment.

	Stress environments						Control environments												
	Asendorf (AS)			Poel 2017 (PL17)			Texcoco (TX)			Gross-Gerau (GG)			Poel 2018 (PL18)			San Juan del Río (SJR)			
n	seed yield per panicle	Seed number	PHI	seed yield per panicle	Seed number	PHI	seed yield per panicle	Seed number	PHI	seed yield per panicle	Seed number	PHI	seed yield per panicle	Seed number	PHI	seed yield per panicle	Seed number	PHI	
s with signif. [<i>p</i> %]	38, 37, 47, 47, 39, 40	23.08	15.38	2.94	10	12.5	0	8.11	8.11	0.98	8.51	2.13	0	6.38	2.13	0	23.68	13.16	0
	38, 37, 47, 47, 39, 40	443.21	298.92	2608.9	163.84	170.71	/	407.51	622.41	380.7	386.36	165.24	/	210.24	180.35	/	197.35	154.82	/
	38, 37, 47, 47, 39, 40	161.32***	88.19**	43.4**	71.29***	41.01***	18.3**	115.88**	106.25**	27.2**	36.3***	11.74	4.9*	35.37***	31.63***	6.5***	92.7***	61.31***	-1.5
	38, 37, 47, 47, 39, 40	0.85***	0.83***	0.79**	0.72***	0.75***	0.73**	0.72***	0.73***	0.73**	0.71***	0.64***	0.65**	0.35***	0.056	0.45***	0.72***	0.75***	0.75**
	39, 40	0.83***	0.83***	0.79**	0.72***	0.75***	0.73**	0.72***	0.73***	0.73**	0.71***	0.64***	0.65**	0.35***	0.056	0.45***	0.72***	0.75***	0.75**
accuracy	7	0.83***	0.55	0.67	0.75*	0.61	0.8*	0.77	0.45	0.44	-0.27	-0.46	0.28	0.33	-0.32	0.62	0.25	0.08	0.29
<i>per se</i>	7	0.72	0.71	0.78*	-0.16	0.12	-0.21	-0.02	0.29	0.16	0.43	0.65	0.31	0.68	0.68	0.072	0.83*	0.80*	-0.44

Correlation MPV: hybrid performance	38, 37,	0.75***	0.63***	0.64**	0.54***	0.44**	0.26	0.42**	0.35*	0.34*	0.09	0.19	0.19	0.30*	0.40**	0.16	0.48***	0.50***	-0.19
	47, 47,																		
	39, 40																		

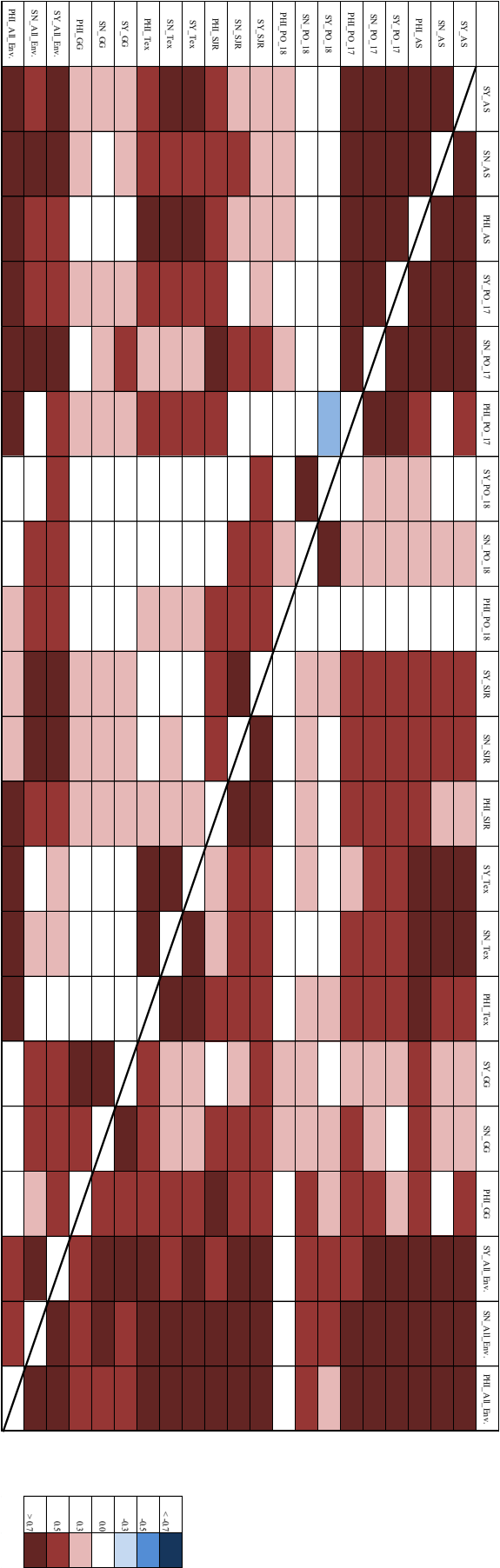


Image S1 : Heat map showing Pearson´s correlation for the reported traits for lines (below the diagonal) and hybrids (above the diagonal).

SY = seed yield per panicle (g); SN = grain number; PHI = panicle harvest index; AS = Asendorf; PO = Poel; SJR = San Juan del Rio (MX); TEX = Texcoco (MX); GG = Gross Gerau

Table S3: Genotypic variances (mean squares) for the traits pollen amount (cells/ml) and viable pollen number (cells/ml), separately for the environments of Gross-Gerau and Rauischholzhausen.

	Gross-Gerau (GG)			Rauischholzhausen (RH)		
Item	d.f.	Pollen amount (cells/ml)	Viable pollen number (cells/ml)	d.f.	Pollen amount (cells/ml)	Viable pollen number (cells/ml)
Entries	28	15763048***	10141103***	29	72806953***	23851385***
	77	5154386	2547797		10833889	4769160
Error				67		
Lines	9	12510617***	5746160**	9	24405486***	20802761***
Error	25	2646725	1385057	20	6926159	3954682
Males	6	13689823**	7946948**	6	20766032	26573697**
Error	17	3675259	1630711	13	8588274	5378791
Females	2	11885661***	1854094	2	32977404**	11812320**
Error	8	461090	863042	7	3839374	1309908
F vs. M	1	6685296	325562	1	29098378	4158034
Hybrids	18	18101005**	10706666***	19	90200575***	26518411***
GCA (F)	2	35318923**	51446005***	2	449576182***	151729653***
		37793183***	13030635***		29525819*	8061626
GCA (M)	6			6		
SCA (F*M)	11	14427470**	4717144	11	56752225***	13203830**
Error	52	6359992	3106807	47	12496753	5115746
L vs. H	1	2951708	39515456**	1	177941319*	615511

*Significant at 0.05 level; **Significant at 0.01 level; ***Significant at 0.001 level.

Table S4: Heterosis, GCA prediction accuracy and Pearson's correlation (r) between line *per se* and hybrid performance for pollen amount and viable pollen number for the field experiments of Gross-Gerau and Rauischholzhausen

	Gross-Gerau (GG)			Rauischholzhausen (RH)		Mean of both environments	
Item	n	Pollen amount	Viable pollen number	Pollen amount	Viable pollen number	Pollen amount	Viable pollen number
[%] of hybrids with sign. HPH	20	6.3	2.1	/	/	6.3	2.1
Max. HPH [%]	20	3	25.5	/	/	393.3	58.4
Average MPH [%] (all MPV-hybrid comparison)	20	-0.015	25.5**	23.5*	16.1	17.6*	21.8
GCA prediction accuracy (R2)	20	0.64***	0.76***	0.69***	0.76***	0.74***	0.76***
Correlation <i>per se</i> M: GCA M	7	-0.04	0.37	0.31	0.68	0.39	0.51
Correlation <i>per se</i> F: GCA F	3	0.9	0.85	-0.35	0.68	0.28	0.82
Correlation MPV: hybrid performance	20	0.23	0.41	-0.12	0.47*	0.23	0.42

*Significant at 0.05 level; **Significant at 0.01 level; ***Significant at 0.001 level.

Table S5: Descriptive statistical data for the field experiments

All environments	Min.	Max.	Mean.
Seed yield per panicle (g)	0.00	133.00	29.96
Seed number	0.00	4502.00	1217.61
PHI	0.00	0.98	0.63
Stress environments			
Seed yield per panicle (g)	0.00	115.80	14.15
Seed number	0.00	3405.88	664.77
PHI	0.00	0.97	0.43
Control environments			
Seed yield per panicle (g)	0.07	133.00	43.33
Seed number	2.00	4502.00	1667.17
PHI	0.004	0.98	0.79
Asendorf			
Seed yield per panicle (g)	0.00	54.32	9.21
Seed number	0.00	2625.00	453.33
PHI	0.00	0.97	0.35
Poel 2017			
Seed yield per panicle (g)	0.00	76.32	19.52
Seed number	0.00	3249.00	999.35
PHI	0.00	0.90	0.52
Poel 2018			

Seed yield per panicle (g)	1.35	121.63	47.47
Seed number	69.00	4502.00	1958.75
PHI	0.14	0.98	0.82
San Juan del Rio			
Seed yield per panicle (g)	2.00	133.00	41.53
Seed number	93.75	3800.00	1379.74
PHI	0.17	0.93	0.76
Texcoco			
Seed yield per panicle (g)	0.00	115.80	13.81
Seed number	0.00	3405.88	531.20
PHI	0.00	0.96	0.42
Gross Gerau			
Seed yield per panicle (g)	0.07	120.84	40.53
Seed number	2.00	4385.00	1602.84
PHI	0.004	0.91	0.78

Table S6: Descriptive statistical data for the climate chamber experiments, and the scored pollen traits in the field experiments of Gross-Gerau and Rauischholzhausen

Mean of both treatments	Min.	Max.	Mean.
Pollen amount (cells/ml)	3419.00	31721.00	15786.74
Viable pollen (cells/ml)	729.00	17927.00	7471.54
PHI	0.00	0.94	0.69
Control treatment			
Pollen amount (cells/ml)	3462.00	31721.00	15210.54
Viable pollen (cells/ml)	1477.00	17927.00	7442.37
PHI	0.21	0.94	0.80
Stress treatment			
Pollen amount (cells/ml)	3419.00	30851.00	16404.84
Viable pollen (cells/ml)	729.00	15374.00	7502.84
PHI	0.00	0.85	0.56
Mean of both fieldexperiments			
Pollen amount (cells/ml)	217.00	31268.00	10379.71
Viable pollen (cells/ml)	52.00	16221.00	4558.15
Gross Gerau			
Pollen amount (cells/ml)	217.00	19280.00	7922.28
Viable pollen (cells/ml)	52.00	14674.00	4027.20
Rauischholzhausen			
Pollen amount (cells/ml)	6215.00	31268.00	13085.36
Viable pollen (cells/ml)	433.00	16221.00	5142.74

Publikation II

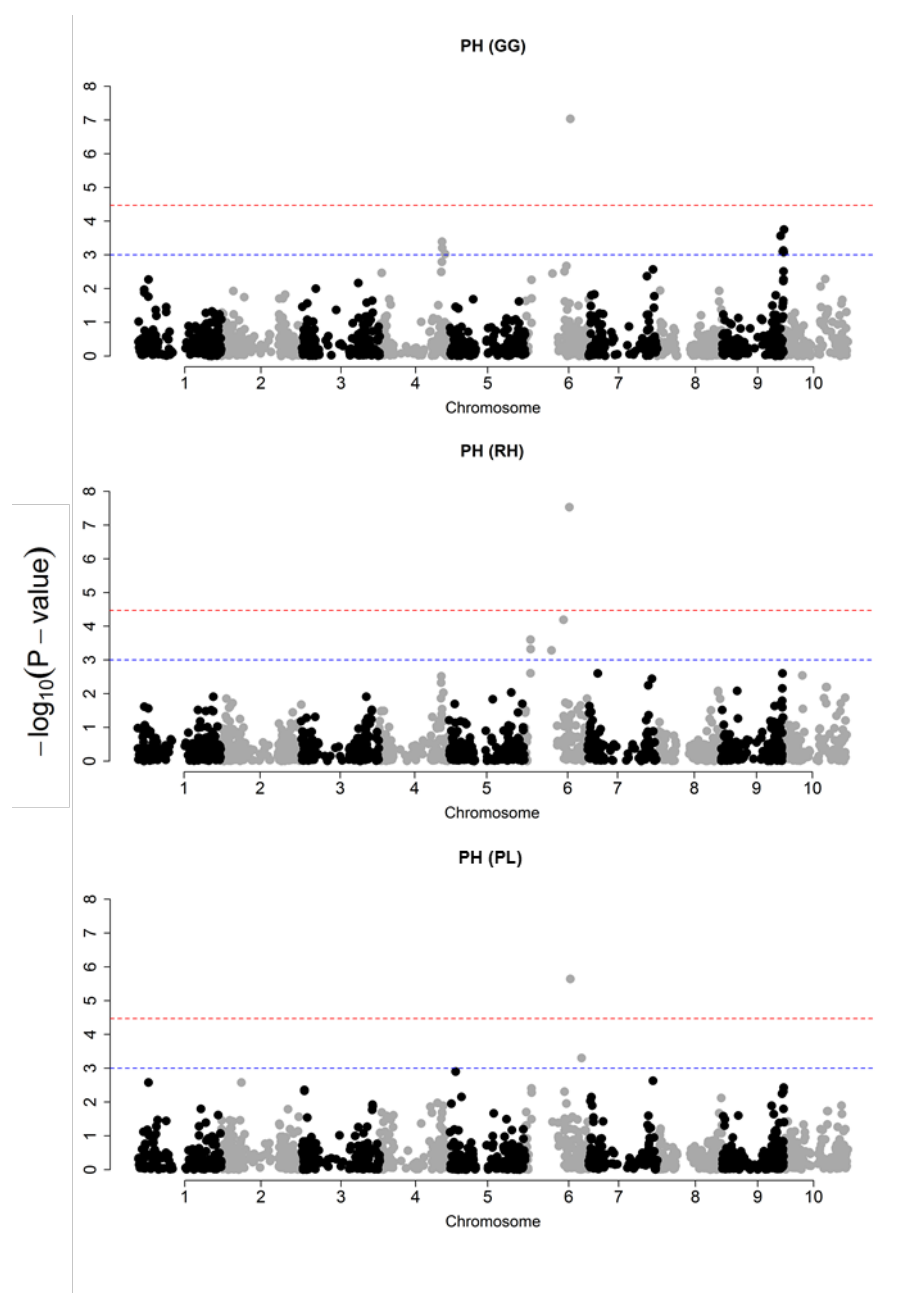


Figure S1: Manhattan plot showing p values and marker–trait associations for PH_GG, PH_RH and PH_PL. Blue horizontal line indicate threshold for significant marker–trait associations ($p < 1 \times 10^{-3}$)

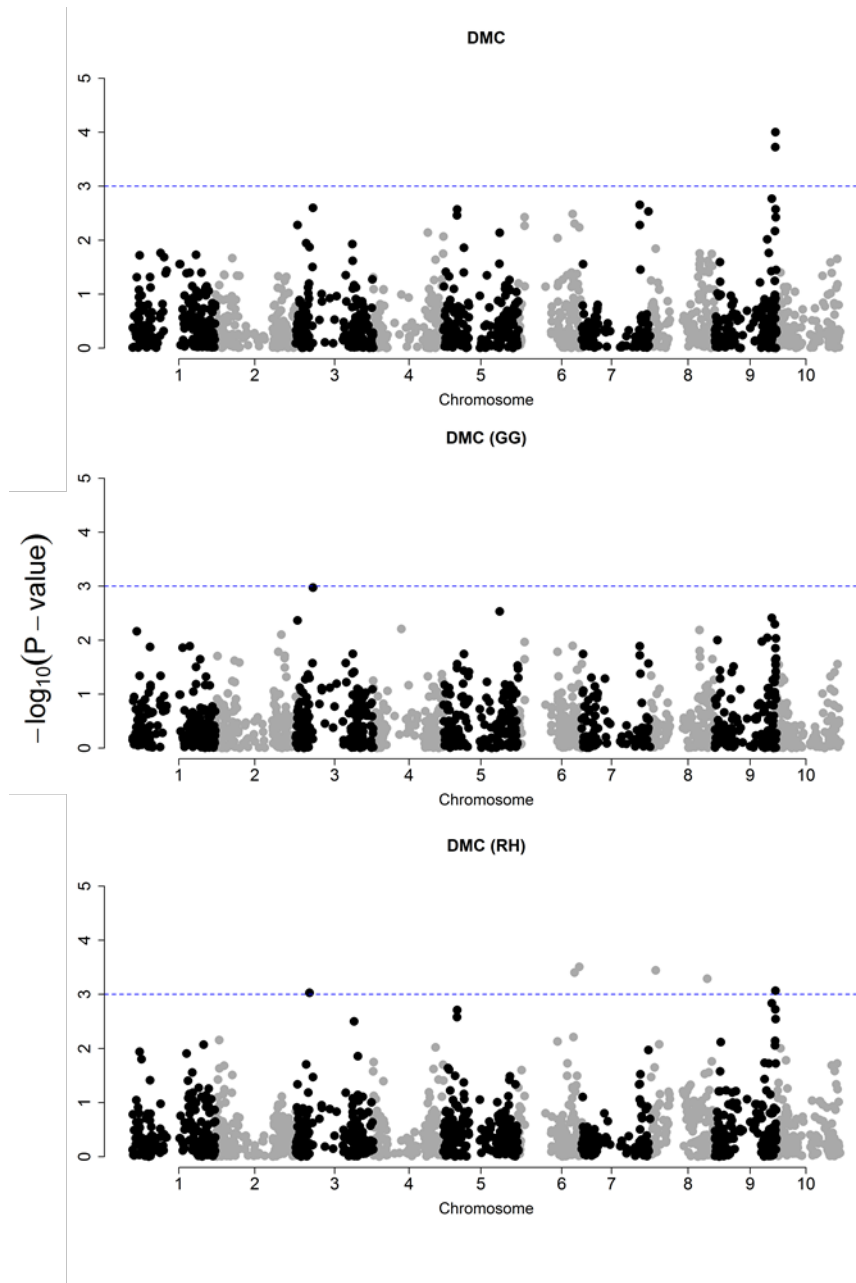


Figure S2: Manhattan plot showing p values and marker–trait associations for DMC, DMC_GG and DMC_RH. Blue horizontal line indicate threshold for significant marker–trait associations ($p < 1 \times 10^{-3}$).

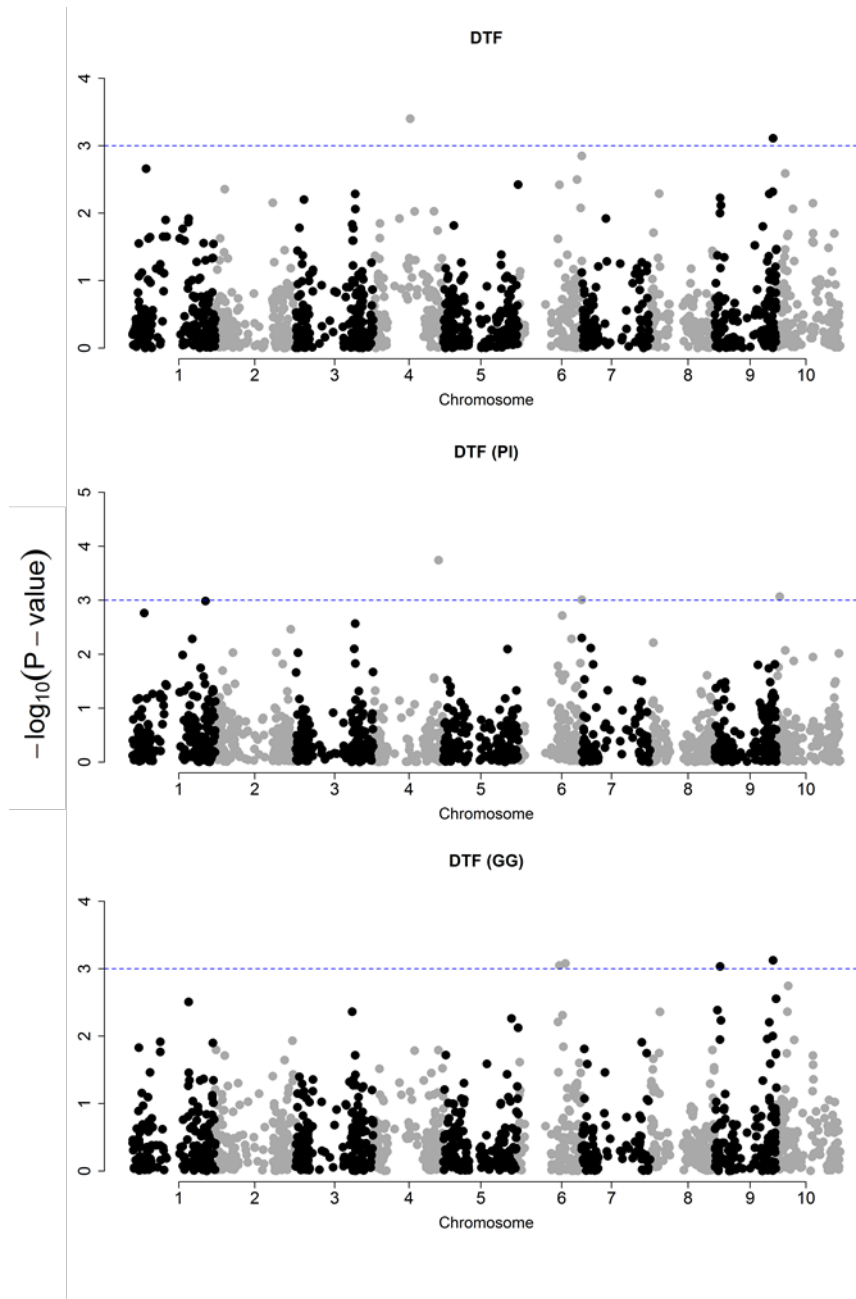


Figure S3: Manhattan plot showing p values and marker-trait associations for DTF, DTF_GG, DTF_RH and DTF_PL. Blue horizontal line indicate threshold for significant marker-trait associations ($p < 1 \times 10^{-3}$).

Table S1: List of all sorghum accessions composing the present diversity set (n = 338), including origin, SC- and PI-Numbers when available.

	SC-Number	PI-Number	Origin	Genetic group as shown in Fig. 4	Comments
1.	-	PI 156890	Zaire	4	
2.	-	PI 457864	Ethiopia	1	
3.	-	PI 482629	Zimbabwe	2	
4.	-	PI 482680	Zimbabwe	5	
5.	-	PI 482767	Zimbabwe	2	
6.	-	PI 641862	USA	2	
7.	-	PI 152759	Sudan	1	
8.	-	PI 273468	Nigeria	2	
9.	-	PI 641834	USA	2	
10.	-	PI 641915	USA	2	
11.	-	PI 535781	USA	1	
12.	-	PI 535789	USA	1	
13.	-	PI 535791	USA	1	
14.	-	PI 535792	USA	1	
15.	-	PI 602736	USA	1	
16.	-	PI 602740	USA	1	
17.	-	PI 602899	USA	1	

18.	-	PI 602903	USA	1	
19.	-	PI 602913	USA	1	
20.	-	PI 602918	USA	1	
21.	-	PI 602724	USA	1	
22.	-	PI 602909	USA	1	
23.	-	PI 639702	USA	2	
24.	-	PI 639704	USA	2	subline 1
25.	-	PI 639704	USA	2	subline 2
26.	-	PI 639708	USA	2	
27.	-	PI 656002	USA	1	BOK11
28.	-	PI 229831	South Africa	2	
29.	-	PI 535796	USA	2	
30.	-	PI 641817	South Africa	2	
31.	-	PI 599699	USA	5	
32.	-	PI 599702	USA	5	
33.	-	PI 599708	USA	5	
34.	-	PI 599710	USA	5	
35.	-	PI 599711	USA	5	
36.	-	PI 599713	USA	5	

37.	-	PI 599715	USA	1	
38.	-	PI 599741	USA	5	
39.	-	PI 599749	USA	5	
40.	-	PI 599750	USA	5	
41.	-	PI 599694	USA	5	
42.	-	PI 602911	USA	1	
43.	-	PI 602732	USA	1	
44.	-	PI 639713	USA	1	
45.	-	PI 639716	USA	1	
46.	-	PI 639717	USA	1	
47.	-	PI 561072	USA/Texas	1	BTxARG-1
48.	-	PI 564163	USA/Texas	1	BTx623
49.	-	PI 152678	Sudan	3	
50.	-	PI 287583	Zimbabwe	3	
51.	-	PI 287589	Zimbabwe	3	
52.	-	PI 22326	Sudan	3	
53.	-	PI 152704	Sudan	3	
54.	-	PI 642995	USA	3	
55.	-	PI 217892	Sudan	3	

56.	-	PI 599701	USA	5
57.	-	PI 599703	USA	5
58.	-	PI 599705	USA	5
59.	-	PI 599706	USA	5
60.	-	PI 599692	USA	5
61.	-	PI 599693	USA	5
62.	-	PI 599697	USA	5
63.	-	PI 571000	Sudan	3
64.	-	PI 201723	Nigeria	4
65.	-	PI 643005	USA	4
66.	-	PI 648048	USA	4
67.	-	PI 648054	USA	4
68.	-	PI 599724	USA	5
69.	-	PI 599728	USA	5
70.	-	PI 599743	USA	4
71.	-	PI 602728	USA	5
72.	-	PI 250897	Iran	2
73.	-	PI 641879	USA	2
74.	-	PI 302123	Portugal	5

75.	-	PI 599712	USA	5	
76.	-	PI 599719	USA	5	
77.	-	PI 599721	USA	5	
78.	-	PI 599726	USA	5	
79.	-	PI 599731	USA	5	
80.	-	PI 599738	USA	5	
81.	-	PI 599742	USA	5	
82.	-	PI 599744	USA	5	
83.	-	PI 599746	USA	5	
84.	-	PI 599747	USA	5	
85.	-	PI 599748	USA	5	
86.	-	PI 535805	USA	5	
87.	-	PI 653617	USA	5	
88.	SC10	PI 534121	Ethiopia	5	
89.	SC100	PI 533791	Nigeria	4	subline 1
90.	SC100	PI 533791	Nigeria	4	subline 2
91.	SC101	PI 533954	South Africa	4	
92.	SC1019	PI 656071	USA	1	Casa et al. 2008
93.	SC103	PI 533752	South Africa	3	Casa et al. 2008

94.	SC1056	PI 576387	Sudan	3	subline 1	Casa et al. 2008
95.	SC1056	PI 576387	Sudan	3	subline 2	
96.	SC1069	PI 576384	Nigeria	1		
97.	SC1074	PI 656073	Nigeria	3		Casa et al. 2008
98.	SC1080	PI 576422	South Africa	1		Casa et al. 2008
99.	SC1085	PI 576401	India	5		Casa et al. 2008
100.	SC1089	PI 595705	India	4		
101.	SC1103	PI 576434	Nigeria	5		Casa et al. 2008
102.	SC1104	PI 576435	Uganda	3	subline 1	Casa et al. 2008
103.	SC1104	PI 576435	Uganda	3	subline 2	
104.	SC1118	PI 595711	USA	4		
105.	SC112	PI 533918	Ethiopia	3		
106.	SC1120	-	origin unknown	3		
107.	SC114	PI 533832	Uganda	3	subline 1	
108.	SC114	PI 533832	Uganda	3	subline 2	
109.	SC115	PI 533965	Uganda	4		Casa et al. 2008
110.	SC1155	PI 576425	Ethiopia	4		Casa et al. 2008
111.	SC1159	PI 595723	Ethiopia	4		
112.	SC1160	PI 576427	Ethiopia	4	subline 1	

113.	SC1160	PI 576427	Ethiopia	4	subline 2	
114.	SC119	-	Zimbabwe	1		
115.	SC12	PI 534122	Ethiopia	4		
116.	SC1201	PI 595743	USA	1		
117.	SC1203	PI 576437	Brazil	4		
118.	SC1205	PI597965	Senegal	3		
119.	SC121	PI 533961	South Africa	1		Casa et al. 2008
120.	SC1214	PI 595745	Burkina Faso	3		Casa et al. 2008
121.	SC1218	PI 656074	USA	3		Casa et al. 2008
122.	SC1229	PI 576415	Nigeria	4	subline 1	
123.	SC1229	PI 576415	Nigeria	4	subline 2	
124.	SC123	PI 534147	Ethiopia	3		
125.	SC124	PI533919	Ethiopia	4		Casa et al. 2008
126.	SC1246	PI 595718	Chad	3		Casa et al. 2008
127.	SC1271	PI 656076	Ethiopia	3		Casa et al. 2008
128.	SC1287	PI 595746	India	3		
129.	SC1302	PI 597962	USA	3		
130.	SC1307	PI 595734	Ethiopia	3		
131.	SC1314	PI 595736	USA	3	subline 1	

132.	SC1314	PI 595736	USA	3	subline 2	
133.	SC1318	PI 597963	Ethiopia	3		
134.	SC1322	PI 660641	Sudan	1		Casa et al. 2008
135.	SC1328	PI 597971	Sudan	3		Casa et al. 2008
136.	SC1333	PI 597975	USA	4		
137.	SC1356	PI 597982	Sudan	3	subline 1	Casa et al. 2008
138.	SC1356	PI 597982	Sudan	3	subline 2	
139.	SC136	PI 534149	Ethiopia	4	subline 1	
140.	SC136	PI 534149	Ethiopia	4	subline 2	
141.	SC140	PI 576431	Ethiopia	4		
142.	SC141	PI 534152	Ethiopia	5		
143.	SC145	PI 656082	Ethiopia	4		Casa et al. 2008
144.	SC146	PI 534154	Ethiopia	5		
145.	SC1494	PI 656090	Sudan	3		Casa et al. 2008
146.	SC15	PI 534124	Ethiopia	4		Casa et al. 2008
147.	SC150	-	origin unknown	4		
148.	SC156	-	origin unknown	4		
149.	SC17	PI 533903	Ethiopia	4		Casa et al. 2008
150.	SC184	PI 597958	South Africa	3		Casa et al. 2008

151.	SC188	PI 533804	Nigeria	4		
152.	SC19	PI 533904	Ethiopia	4	subline 1	
153.	SC19	PI 533904	Ethiopia	4	subline 2	
154.	SC192	PI576390	India	4		Casa et al. 2008
155.	SC196	PI 597943	India	4		
156.	SC20	PI 534126	Ethiopia	4		
157.	SC207	PI 533815	India	5	subline 1	
158.	SC207	PI 533815	India	5	subline 2	
159.	SC208	PI 533816	India	4		
160.	SC21	PI534127	Ethiopia	4		Casa et al. 2008
161.	SC210	PI 533942	India	4		
162.	SC217	PI 533926	India	4		
163.	SC224	PI 533927	Ethiopia	5		Casa et al. 2008
164.	SC233	PI 533746	India	4		
165.	SC256	PI 533818	Nigeria	4		
166.	SC258	PI 533749	Africa	2		
167.	SC259	PI 576334	Sudan	3		
168.	SC273	PI 534062	Nigeria	4		
169.	SC279	PI534070	Nigeria	4		Casa et al. 2008

170.	SC292	PI 533782	Nigeria	4		
171.	SC299	PI 533785	Nigeria	4	subline 1	Casa et al. 2008
172.	SC299	PI 533785	Nigeria	4	subline 2	
173.	SC303	PI533839	Nigeria	4		Casa et al. 2008
174.	SC306	PI 533958	USA	4		
175.	SC309	PI 533754	Sudan	4		Casa et al. 2008
176.	SC311	PI 533753	Sudan	2		
177.	SC319	PI 533833	Uganda	3		Casa et al. 2008
178.	SC322	PI 533821	Tanzania	4		Casa et al. 2008
179.	SC331	PI 533824	Nigeria	4		
180.	SC334	PI 533986	Sudan	3		Casa et al. 2008
181.	SC338	PI 534044	Sudan	3		
182.	SC344	PI 533774	Nigeria	3		
183.	SC349	PI 595712	USA	3		
184.	SC352	PI 534042	Sudan	3		
185.	SC353	PI 533777	Nigeria	4		
186.	SC354	PI 533890	Nigeria	4		
187.	SC36	PI 533907	Ethiopia	5		
188.	SC368	PI 533873	Nigeria	1		

189.	SC37	PI 534134	Ethiopia	3		
190.	SC372	PI533878	Nigeria	2		
191.	SC377	PI 534082	Nigeria	4		
192.	SC38	PI 534135	Ethiopia	4		Casa et al. 2008
193.	SC392	PI 533770	Nigeria	3	subline 1	
194.	SC392	PI 533770	Nigeria	3	subline 2	
195.	SC405	PI 533835	Sudan	3		
196.	SC411	PI 533866	Sudan	3		Casa et al. 2008
197.	SC413	PI 534079	Nigeria	4		Casa et al. 2008
198.	SC423	PI 533758	Sudan	3	subline 1	Casa et al. 2008
199.	SC423	PI 533758	Sudan	3	subline 2	
200.	SC427	PI 533899	Nigeria	1		
201.	SC44	PI 533908	Ethiopia	4		
202.	SC466	PI 533981	India	1		
203.	SC50	PI 533787	Sudan	3		
204.	SC508	PI 533999	Ethiopia	4		
205.	SC512	PI 534008	India	5		
206.	SC52	PI 533830	Sudan	3		Casa et al. 2008
207.	SC525	PI 656101	Nigeria	3		Casa et al. 2008

208.	SC526	PI 534086	Nigeria	5		
209.	SC536	PI 534084	Nigeria	4		
210.	SC538	PI 534091	Nigeria	4		
211.	SC55	PI 533755	Sudan	3		Casa et al. 2008
212.	SC557	PI 533939	Mosambique	2		Casa et al. 2008
213.	SC562	PI 533987	Sudan	3		Casa et al. 2008
214.	SC563	PI 533876	Nigeria	1	subline 1	Casa et al. 2008
215.	SC563	PI533876	Nigeria	1	subline 2	
216.	SC566	PI 533871	Nigeria	4	subline 1	Casa et al. 2008
217.	SC566	PI 533871	Nigeria	4	subline 2	
218.	SC569	PI 534092	Nigeria	2		Casa et al. 2008
219.	SC578	PI 533870	Nigeria	2		
220.	SC598	PI576337	Uganda	4		Casa et al. 2008
221.	SC60	PI533962	Sudan	3		Casa et al. 2008
222.	SC600	PI 576336	Sudan	4		
223.	SC603	PI 533936	Tanzania	2		Casa et al. 2008
224.	SC606	PI 597946	China	5		Casa et al. 2008
225.	SC609	PI 576332	China	2	subline 1	Casa et al. 2008
226.	SC609	PI 576332	China	2	subline 2	

227.	SC614	PI533940	Tanzania	5	subline 1	Casa et al. 2008
228.	SC614	PI 533940	Tanzania	5	subline 2	
229.	SC62	PI 534138	Sudan	3	subline 1	
230.	SC62	PI 534138	Sudan	3	subline 2	
231.	SC620	PI 576341	South Africa	2		
232.	SC621	PI 656104	India	4		Casa et al. 2008
233.	SC624	PI576366	India	4		Casa et al. 2008
234.	SC625	PI 534097	Japan	2		Casa et al. 2008
235.	SC628	PI533979	South Africa	1		Casa et al. 2008
236.	SC629	PI 597947	USA	1		
237.	SC63	PI 533912	Sudan	3		Casa et al. 2008
238.	SC630	PI 533937	Zimbabwe	5		Casa et al. 2008
239.	SC634	PI 533929	Peru	2		
240.	SC635	PI 576329	USA	1		
241.	SC64	PI 533757	Sudan	3		Casa et al. 2008
242.	SC642	PI 534109	India	3		
243.	SC643	PI 534110	India	3		
244.	SC645	PI 534108	Uganda	4	subline 1	Casa et al. 2008
245.	SC645	PI534108	Uganda	4	subline 2	

246.	SC646	PI 534107	Uganda	1		
247.	SC649	PI 576332	Zimbabwe	3		
248.	SC655	PI 533976	South Africa	3		Casa et al. 2008
249.	SC659	PI 576333	USA	1		Casa et al. 2008
250.	SC663	PI 533948	United States	1		Casa et al. 2008
251.	SC67	PI 534139	Sudan	2		Casa et al. 2008
252.	SC672	PI 595702	India	2	subline 1	Casa et al. 2008
253.	SC672	PI 595702	Zimbabwe	2	subline 2	
254.	SC672	PI 595702	Zimbabwe	2	subline 3	
255.	SC673	PI 576339	Zimbabwe	1		Casa et al. 2008
256.	SC679	PI 534046	Sudan	4		Casa et al. 2008
257.	SC682	PI 576392	South Africa	1		
258.	SC687	PI 534038	Sudan	4		
259.	SC689	PI 533969	Uganda	3		
260.	SC691	PI 534050	Burkina Faso	2	subline 1	
261.	SC691	PI 534050	Burkina Faso	2	subline 2	
262.	SC692	PI 533966	Uganda	3	subline 1	
263.	SC692	PI 533966	Uganda	3	subline 2	
264.	SC695	PI 656106	USA	3		Casa et al. 2008

265.	SC7	PI 534120	Ethiopia	4		
266.	SC700	PI 576346	South Africa	1		
267.	SC701	PI 533985	Sudan	3		Casa et al. 2008
268.	SC702	PI 656107	Sudan	3		Casa et al. 2008
269.	SC704	PI 534099	Japan	3	subline 1	Casa et al. 2008
270.	SC704	PI 534099	Japan	3	subline 2	
271.	SC705	PI 576420	Japan	3		
272.	SC709	PI 533990	Sudan	2		
273.	SC720	PI 659696	Kenya	2		Casa et al. 2008
274.	SC721	PI 534100	Japan	1		
275.	SC723	PI 533988	Sudan	3		
276.	SC733	PI 534061	Nigeria	3		
277.	SC748	PI 533991	Sudan	3		Casa et al. 2008
278.	SC755	PI 576350	origin unknown	5		
279.	SC757	PI 576352	Botswana	1		Casa et al. 2008
280.	SC760	PI 533949	Sudan	3		Casa et al. 2008
281.	SC762	PI 576363	India	3	subline 1	
282.	SC762	PI 576363	India	3	subline 2	
283.	SC782	PI 576364	India	2		Casa et al. 2008

284.	SC79	PI 533915	Kenya	3		Casa et al. 2008
285.	SC798	PI 533989	Sudan	3		Casa et al. 2008
286.	SC803	PI 533964	Sudan	4		Casa et al. 2008
287.	SC807	PI 576370	Zimbabwe	3		
288.	SC810	PI 533930	Sudan	4		
289.	SC833	PI 656108	India	4		Casa et al. 2008
290.	SC851	PI 576342	Egypt	2		
291.	SC90	PI 533916	Zaire	3		
292.	SC91	PI 534145	Zimbabwe	4		Casa et al. 2008
293.	SC937	PI 576348	USA	5		Casa et al. 2008
294.	SC94	PI 533950	Sudan	4		
295.	SC941	PI 576347	United States	5	subline 1	Casa et al. 2008
296.	SC941	PI 576347	United States	5	subline 2	
297.	SC942	PI 576349	USA	5		Casa et al. 2008
298.	SC96	PI 533951	Nigeria	3		
299.	SC963	PI 533977	Sudan	3		
300.	SC97	PI 533917	Nigeria	4		
301.	SC979	PI 576428	Ethiopia	3		Casa et al. 2008
302.	SC98	PI 533790	Nigeria	4		

303.	SC982	PI 576380	Ethiopia	3		Casa et al. 2008
304.	SC984	PI 534115	Ethiopia	3	subline 1	Casa et al. 2008
305.	SC984	PI 534115	Ethiopia	3	subline 2	
306.	SC987	PI534116	Ethiopia	4		Casa et al. 2008
307.	SC99	PI 576383	Nigeria	4		
308.	-	-	South Africa	2		uncataloged breeding line
309.	-	-	USA	2		uncataloged breeding line
310.	-	-	USA	2		uncataloged breeding line
311.	-	-	USA	2		uncataloged breeding line
312.	-	-	USA	2		uncataloged breeding line
313.	-	-	USA	2		uncataloged breeding line
314.	-	-	USA	2		uncataloged breeding line
315.	-	-	USA	2		uncataloged breeding line
316.	-	-	USA	2		uncataloged breeding line
317.	-	-	Sudan	2		uncataloged breeding line
318.	-	-	Mexiko	1		uncataloged breeding line
319.	-	-	Hungary	3		uncataloged breeding line
320.	-	-	Hungary	3		uncataloged breeding line
321.	-	-	Hungary	3		uncataloged breeding line

322.	-	-	Hungary	3	uncataloged breeding line
323.	-	-	Hungary	3	uncataloged breeding line
324.	-	-	Hungary	3	uncataloged breeding line
325.	-	-	Hungary	3	uncataloged breeding line
326.	-	-	Hungary	3	uncataloged breeding line
327.	-	-	Hungary	3	uncataloged breeding line
328.	-	-	Sudan	3	uncataloged breeding line
329.	-	-	USA	2	uncataloged breeding line
330.	-	-	origin unknown	1	uncataloged breeding line
331.	-	-	India	4	uncataloged breeding line
332.	-	-	Zimbabwe	2	uncataloged breeding line
333.	-	-	origin unknown	2	uncataloged breeding line
334.	-	-	origin unknown	5	uncataloged breeding line
335.	-	-	origin unknown	1	uncataloged breeding line
336.	-	-	Sudan	3	uncataloged breeding line
337.	-	-	origin unknown	3	uncataloged breeding line
338.	-	-	origin unknown	1	uncataloged breeding line

Table S2 and S3: Mean values of the cold tolerance and bioenergy related traits, attached in two separate Excel sheets (Table S2 and S3).

Für weitere Informationen siehe: <https://www.mdpi.com/2073-4395/9/9/535#supplementary>

Table S4: Significant SNP-trait associations for the considered traits.

Trait	SNP	Chromosome	p-Value	R ² -Value	Nucleotide Variation	SNP-position (bp)
SDW (GI14)	UGSDII_08294	SB-05	3.86E-04	4	G / A	62384486
EM (GI14)	UGSDII_11303	SB-07	3.08E-04	4.1	A / G	56208611
SDW (CC)	UGSDI_04240	SB-01	9.58E-04	3.3	C / A	78676808
RDW (CC)	UGSDI_29770	SB-06	8.22E-04	3.4	A / G	59260057
	UGSDII_01333	SB-01	9.37E-04	3.3	G / A	74782432
EM (CC)	UGSDII_15511	SB-10	9.35E-04	3.3	G / A	1863544
EI (CC)	UGSS_03628	SB-04	1.19E-04	4.5	G / A	7881046
	UGSS_03587	SB-04	4.05E-04	3.8	A / C	7320385
	UGSDII_00260	SB-01	7.29E-04	3.5	A / G	17795419
	UGSDII_06028	SB-04	8.69E-04	3.4	A / G	7862672
LG	UGSS_03543	SB-04	3.93E-04	4.1	G / A	64093958
	UGSS_00460	SB-10	1.01E-03	3.5	C / A	58963577
SD	UGSDII_12241	SB-08	5.66E-06	5.9	G / A	9036103
	UGSDI_29686	SB-06	1.90E-05	5.5	A / G	58421671
	UGSDII_12684	SB-08	4.31E-04	3.7	G / A	38019484
	UGSDII_04219	SB-02	6.61E-04	3.4	C / A	68060348

	UGSS_05385	SB-08	1.08E-03	3.1	G / A	3364066
Brix	UGSDII_09970	SB-06	4.81E-06	6.1	A / G	43116491
	UGSDII_00557	SB-01	1.28E-04	4.3	G / A	54955149
	UGSDII_11327	SB-07	1.58E-04	4.2	A / G	57399747
DTF	UGSDI_15997	SB-04	3.99E-04	3.7	G / A	36779840
	UGSS_06303	SB-09	7.79E-04	3.4	A / C	55465011
DTF (PL)	UGSDI_19037	SB-04	1.82E-04	6.5	A / C	64066222
	UGSDII_15573	SB-10	8.60E-04	5.1	G / A	3240266
	UGSDII_10437	SB-06	9.85E-04	5	G / A	60837294
	UGSDII_01141	SB-01	1.04E-03	5	A / C	70977156
DTF (GG)	UGSS_06303	SB-09	7.53E-04	3.5	A / C	55465011
	UGSDI_27279	SB-06	8.38E-04	3.4	G / A	45139408
	UGSDII_09315	SB-06	9.00E-04	3.4	G / A	39409195
	UGSDI_34730	SB-09	9.28E-04	3.6	G / A	4892471
DMC	UGSDI_41825	SB-09	9.97E-05	4.4	A / G	57839999
	UGSDI_41725	SB-09	1.89E-04	4.1	A / C	57654444
DMC (GG)	UGSDI_12094	SB-03	1.00E-03	3.9	A / C	16635250
DMC (RH)	UGSDI_29686	SB-06	3.10E-04	4.7	A / G	58421671
	UGSDII_11940	SB-08	3.62E-04	4.4	A / G	5661324
	UGSS_04937	SB-06	3.97E-04	4.4	G / A	53923407
	UGSDII_14005	SB-08	5.15E-04	4.1	G / A	54954344

	UGSDI_41825	SB-09	8.58E-04	3.9	A / G	57839999
	UGSS_02587	SB-03	9.38E-04	3.8	G / A	13412555
PH	UGSDII_09970	SB-06	2.90E-08	8.7	A / G	43116491
	UGSDI_31745	SB-07	4.44E-04	3.6	G / A	61209416
	UGSDI_17678	SB-04	8.87E-04	3.3	A / C	61115697
PH (GG)	UGSDII_09970	SB-06	9.33E-08	8.1	A / G	43116491
	UGSDI_42192	SB-09	1.78E-04	4.2	C / A	58679043
	UGSS_06303	SB-09	2.75E-04	4	A / C	55465011
	UGSDI_17598	SB-04	4.06E-04	3.7	G / A	60920780
	UGSDI_17678	SB-04	6.25E-04	3.5	A / C	61115697
	UGSDI_41984	SB-09	7.43E-04	3.5	G / A	58157439
	UGSDI_41725	SB-09	8.04E-04	3.3	A / C	57654444
	UGSDI_42063	SB-09	8.38E-04	3.4	G / A	58334819
	UGSDI_18909	SB-04	9.46E-04	3.3	G / A	63894943
PH (RH)	UGSDII_09970	SB-06	2.97E-08	9.2	A / G	43116491
	UGSS_04658	SB-06	6.47E-05	5	G / A	37521484
	UGSDI_26861	SB-06	2.51E-04	4.2	A / G	6109284
	UGSDI_26862	SB-06	4.80E-04	4.1	G / A	6217254
	UGSDI_26882	SB-06	5.22E-04	3.8	A / G	26143987
PH (PL)	UGSDII_09970	SB-06	2.30E-06	7.5	A / G	43116491
	UGSS_04937	SB-06	5.01E-04	4.3	G / A	53923407