

Untersuchungen der Interaktion von Stickstoffnutzeffizienz und Wurzelarchitektur bei Mais

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Christian Alexander Wever

aus Meerbusch

Düsseldorf, März 2017

aus dem Institut für Entwicklungs- und Molekularbiologie der Pflanzen
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Professor Dr. Peter Westhoff

Korreferentin: Professor Dr. Maria von Korff Schmising

Tag der mündlichen Prüfung:

Inhaltsverzeichnis

1	<u>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</u>	6
2	<u>TABELLENVERZEICHNIS</u>	8
3	<u>ABKÜRZUNGEN UND SYMBOLE</u>	8
4	<u>EINLEITUNG</u>	12
4.1	BEDEUTUNG DER NÄHRSTOFFNUTZEFFIZIENZ FÜR DIE LANDWIRTSCHAFT DES 21. JAHRHUNDERTS	12
4.2	STICKSTOFF: ESSENTIELL FÜR DAS PFLANZENWACHSTUM, FOLGENSCHWER FÜR DIE UMWELT	14
4.2.1	NITRAT ALS NÄHRSTOFF UND SEINE WIRKUNG AUF DIE PFLANZE IM BODEN	16
4.2.2	AKTIVE STICKSTOFFAUFNAHME IN DER WURZEL AUF MOLEKULARER EBENE DURCH TRANSPORTSYSTEME	16
4.3	DAS WURZELSYSTEM UND DESSEN GENETISCHE REGULIERUNG BEI <i>ZEA MAYS</i>	20
4.3.1	DIE HOMORHIZE WURZELARCHITEKTUR DER <i>POACEAE ZEA MAYS</i>	20
4.3.2	GENETISCHE REGULATION DER WURZELARCHITEKTUR BEI <i>ZEA MAYS</i>	22
4.4	OPTIMIERUNG DER MAISWURZELARCHITEKTUR FÜR NITRATMANGELBEDINGUNGEN	24
4.4.1	DEFINITION DER STICKSTOFFNUTZEFFIZIENZ FÜR DIE ANALYSIERTEN MAISPFLANZEN	26
4.5	LOCI FÜR QUANTITATIVE EIGENSCHAFTEN	26
4.5.1	QUANTITATIVE EIGENSCHAFTEN UND DEREN BEDEUTUNG IN DER PFLANZENZÜCHTUNG	27
4.5.2	VORAUSSETZUNGEN UND STRATEGIE EINER QTL-KARTIERUNG	28
4.6	PROBLEMATIK BEI DER PHÄNOTYPISIERUNG VON WURZELMERKMALEN	30
4.6.1	MESSUNG DER ELEKTRISCHEN KAPAZITÄT VON WURZELN – EINE NICHT-INVASIVE <i>IN-SITU</i> -LÖSUNG	30
4.7	ENTWICKLUNG DES ANALYSIERTEN PFLANZENMATERIALS, QTL-BERECHNUNG UND VORANGEGANGENDE UNTERSUCHUNGEN	31
4.7.1	VORANGEGANGENE UNTERSUCHUNGEN AN DEN MAISLINIEN SL UND TH UND DEREN NACHKOMMEN	34
4.7.2	ÄNDERUNG DER QTL-LOCI NACH NEUBERECHNUNG MIT DEUTLICH GRÖßERER MARKERANZAHL ZUM PROJEKTENDE	36
4.8	ZIELE DER DISSERTATION	38
5	<u>MATERIAL UND METHODEN</u>	40
5.1	CHEMIKALIEN	40
5.1.1	ENZYME	40
5.1.2	REAGENZIENSÄTZE	40

5.1.3	OLIGONUKLEOTIDE	41
5.1.4	WEITERE REAGENZIEN	41
5.2	PFLANZENMATERIAL	42
5.2.1	SAATGUTPRODUKTION UND -QUALITÄT	42
5.2.2	ÜBERSICHT ÜBER DIE VERWENDETEN SAATGUTCHARGEN IN DEN LABORVERSUCHEN	42
5.2.3	BEIZEN DES SAATGUTS	43
5.3	PHÄNOTYPISIERUNG DER PFLANZEN	44
5.3.1	ALLGEMEINE PHÄNOTYPISIERUNGSMETHODEN	44
5.3.2	ENTFERNUNG VON NÄHRLÖSUNG IM APOPLASMATISCHEN TRANSPORTBEREICH	44
5.3.3	VERMESSUNG DER WURZELN UND WURZELSYSTEME MIT DEM PROGRAMM WINRHIZO™	45
5.3.4	MESSUNG DER ELEKTRISCHEN KAPAZITÄT VON MAISWURZELN	45
5.3.5	MESSUNG DER AUSTRITTSWINKEL VON KRONWURZELN	47
5.3.6	BESTIMMUNG DES STICKSTOFF- BZW. KOHLENSTOFFGEGHALTES UND BERECHNUNG DER STICKSTOFFNUTZEFFIZIENZ	48
5.3.7	HYPOTHESENTEST UND FESTLEGUNG DER SIGNIFIKANZNIVEAUS	48
5.4	FELDVERSUCHE BEI UNTERSCHIEDLICHER NITRATZUFUHR	49
5.5	KULTIVIERUNG VON MAISKEIMLINGEN BZW. -PFLANZEN UNTER KONTROLLIERTEN ODER SEMIKONTROLLIERTEN BEDINGUNGEN	50
5.5.1	ANZUCHT DER PFLANZEN IN KEIMROLLEN	50
5.5.2	ANZUCHT DER PFLANZEN IN HYDROKULTUR	52
5.5.2.1	Nährlösungen für die Hydrokultur der analysierten Maispflanzen	54
5.5.2.2	Kulturschemata für die Hydrokultur	56
5.5.3	ANZUCHT DER PFLANZEN IN SAND	58
5.5.3.1	Nährlösungen für die Sandkultur	58
5.5.3.2	Kulturschema für die Sandkultur	59
5.6	TRANSKRIPТОMANALYSE	60
5.6.1	ALLGEMEINE MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	60
5.6.2	ISOLIERUNG, QUANTIFIZIERUNG UND QUALITÄTSKONTROLLE VON RNS, SOWIE DER MRNS BIBLIOTHEKEN	61
5.6.3	ERSTELLUNG DER RNS-BIBLIOTHEKEN UND QUALITÄTSKONTROLLE	62
5.6.4	SEQUENZIERUNG DER RNS-BIBLIOTHEKEN	63
5.6.5	STATISTISCHE AUSWERTUNG UND FILTERUNG DER TRANSKRIPТОMDATEN	63
5.6.6	VERIFIZIERUNG DER ANALYSIERTEN MAISLINIEN MITTELS GENETISCHER MARKER	65
6	ERGEBNISSE	68
6.1	METHODEN FÜR WURZELSYSTEMANALYSEN VON ZEA MAYS	68
6.1.1	ETABLIERUNG DER KULTUR VON MAISPFLANZEN IN SAND	68

6.1.2	VERIFIZIERUNG DER MESSUNG DER ELEKTRISCHEN KAPAZITÄT VON MAISWURZELN ALS METHODE ZUR <i>IN-SITU</i> PHÄNOTYPISIERUNG AUF DEM FELDE	68
6.1.3	MESSUNG DER ELEKTRISCHEN KAPAZITÄT VON WURZELN UNTER FELDBEDINGUNGEN	70
6.1.4	MESSUNG DER ELEKTRISCHEN KAPAZITÄT VON WURZELN UNTER KONTROLLIERTEN GEWÄCHSHAUSBEDINGUNGEN IM GEFÄßVERSUCH	73
6.2	GENETISCHE ANALYSE DER WURZELARCHITEKTUR BEI <i>ZEAMAYS</i>	77
6.2.1	DIE KRON- UND STÜTZWURZELARCHITEKTUR VON SL UND TH UNTERSCHIEDET SICH UNTER FELDBEDINGUNGEN	77
6.2.2	LIEGEN DIE GENE FÜR DIE UNTERSCHIEDE IN DER KRON- UND STÜTZWURZELARCHITEKTUR VON SL UND TH IN EINEM DER BEIDEN ERTRAGS-QTL?	78
6.2.3	DIE PHÄNOTYPISCHEN UNTERSCHIEDE IN DER KRON- UND STÜTZWURZELARCHITEKTUR SIND IM HETEROZYGOTEN ZUSTAND SCHWERER ERKENNBAR	80
6.2.4	VERIFIZIERUNG DES KRON- UND STÜTZWURZELPHÄNOTYPS UND GROBKARTIERUNG DER KRONWURZELWINKEL UNTER GEWÄCHSHAUSBEDINGUNGEN	82
6.2.5	FEINKARTIERUNG DER KRONWURZELWINKEL AUF CHROMOSOM 10	86
6.2.6	VERGLEICH DER ERGEBNISSE DER FEINKARTIERUNG DER KRONWURZELWINKEL MIT DER WURZELARCHITEKTUR ADULTER PFLANZEN UNTER FELDBEDINGUNGEN	91
6.2.7	FEINKARTIERUNG DER HÖHEREN LATERALWURZELDICHTE DER LINIE SL AUF DEM CHROMOSOM 8	93
6.2.8	VERGLEICH DER LATERALWURZELENTWICKLUNG DER ELTERNLINIEN SL UND TH IN SANDKULTUR	93
6.3	PHYSIOLOGISCHE UND MOLEKULARBIOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN DER REAKTION VON SL UND TH AUF NITRAT	96
6.3.1	QUANTIFIZIERUNG DER REAKTION DER ELTERNLINIEN AUF VERSCHIEDEN HOHE NITRATKONZENTRATIONEN ANHAND DER PRIMÄRWURZELENTWICKLUNG	96
6.3.2	QUANTIFIZIERUNG DES GESAMT-STICKSTOFFSTATUS DER TROCKENMASSE BEIDER ELTERN	97
6.3.3	GENETISCHE KONTROLLE VON TRANSKRIPTOMVERÄNDERUNGEN DER ELTERNLINIEN SL UND TH BEI UNTERSCHIEDLICHER STICKSTOFFZUFUHR	102
6.3.3.1	Finden sich zwischen den Elternlinien SL und TH neben der phänotypischen Reaktion auch Unterschiede auf Ebene der genetischen Regulation?	102
6.3.3.2	Die Linien TH und SL zeigten <i>per se</i> ein global unterschiedliches Transkriptomverhalten und auf Nitratzugaben der gleichen Stärke ähnliche Reaktionen	103
6.3.3.3	Reaktion der genetischen Kontrolle des Transkriptomverhaltens der Linien SL und TH auf unterschiedlich starke Nitratzufuhren	105
6.3.3.4	Direkter Vergleich der molekularen Antwort auf die Stickstoffmenge der Linien SL und TH	111
6.3.3.5	Charakterisierung und Analyse des Transkriptionsverhaltens potentieller Kandidatengene bei den Elternlinien SL und TH	114

7	<u>DISKUSSION</u>	119
7.1	ZWEI CHROMOSOMENBEREICHE BEIM ERTRAGS-QTL 10 BEEINFLUSSEN DIE KRONWURZELARCHITEKTUR	120
7.1.1	FLACHERE AUSTRITTSWINKEL DER KRONWURZEL SORGEN ENTGEGEN DER GÄNGIGEN MEINUNG FÜR EINE STICKSTOFFNUTZEFFIZIENTERE WURZELARCHITEKTUR	122
7.1.2	DER UNTERSCHIED DER LATERALWURZELDICHTE VON PRIMÄRWURZELN IST ZWISCHEN DEN ELTERNLINIEN BEI NIEDRIGEN STICKSTOFFBEDINGUNGEN GROS	124
7.2	DIE INTERAKTION VON GENOTYP UND ÄUßERER STICKSTOFFBEDINGUNG SIND BEI DEN ELTERNLINIEN STARK UNTERSCHIEDLICH – SL ZEIGT KEINE REAKTION AUF STEIGENDE STICKSTOFFBEDINGUNGEN	125
7.2.1	DER STICKSTOFFSTATUS DER ELTERNLINIEN SL UND TH UNTERSCHIEDET SICH NUR GERINGFÜGIG	125
7.2.2	DIE MESSUNG DER ELEKTRISCHEN KAPAZITÄT VON WURZELSYSTEMEN IST EINE <i>IN-SITU</i> -METHODIK MIT NUR BEDINGT REPRODUZIERBAREN ERGEBNISSEN FÜR DIE ANALYSIERTEN MAISLINIEN	127
7.3	VERGLEICHENDE ANALYSE DER RNS-PEGEL DER UNTERSCHIEDLICH EFFIZIENT STICKSTOFF NUTZENDEN MAISLINIEN SL UND TH	128
7.3.1	DIE EFFIZIENTER STICKSTOFF NUTZENDE LINIE SL ZEIGT KEINE ERHÖHTEN TRANSKRIPTPEGEL FÜR DIE IN MAIS BEKANNTEN NITRATTRANSPORTERGENE	129
7.3.2	DAS FÜR DIE KRON- UND SEMINALWURZELARCHITEKTUR VON MAIS RELEVANTE GEN <i>RTCL1</i> ZEIGT KONSTANT HÖHERE RNS-PEGEL BEIM ELTER SL	130
8	<u>ZUSAMMENFASSUNGEN</u>	133
8.1	DEUTSCHE ZUSAMMENFASSUNG	133
8.2	ENGLISCHE ZUSAMMENFASSUNG	135
9	<u>APPENDIX</u>	137
9.1	BERECHNUNG DER STICKSTOFFNUTZEFFIZIENZ IM WURZELGEWEBE DER BEIDEN ELTERNLINIEN	137
9.2	VERIFIZIERUNG DER GENETISCHEN ECHTHEIT DER IN DER TRANSKRIPTOMSEQUENZIERUNG VERWENDETEN ELTERNLINIEN MITTELS SSR-MARKERN	138
9.3	ANALYSE DER VERGLEICHBARKEIT DER EINZELNEN SEQUENZIIERTEN TRANSKRIPTOME	140
10	<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	143
11	<u>EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG</u>	150
12	<u>DANKSAGUNG</u>	FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.

1 Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1. QUERSCHNITT DURCH DIE PRIMÄRWURZEL EINER MAISPFLANZE NACH 25 TAGEN WACHSTUM.....	17
ABBILDUNG 3. DAS HOMORHIZE WURZELSYSTEM VON MAIS.....	21
ABBILDUNG 5. ÜBERSICHT ÜBER DIE LAGE DER KARTIERTEN QTLs FÜR KORNERTRAG.....	33
ABBILDUNG 6. KORRELATION ZWISCHEN KORNERTRAG UND LATERALWURZELDICHTE VON DH-LINIEN.....	35
ABBILDUNG 7 SCHEMATISCHE DARSTELLUNG VON ALTEN UND NEU BERECHNETEN ERTRAG-QTLs AUF DEN CHROMOSOMEN 8 UND 10.....	37
ABBILDUNG 8. MESSUNG DER ELEKTRISCHEN KAPAZITÄT VON WURZELN IM VERSUCHSFELD.....	46
ABBILDUNG 9. SCHEMA ZUR MESSUNG DER AUSTRITTSWINKEL VON KRONWURZELN.....	47
ABBILDUNG 10 MAISKEIMLINGE IN DER KEIMROLLENKULTUR	51
ABBILDUNG 12. ÜBERFÜHRUNG DER KEIMLINGE IN DIE HYDROPONISCHE KULTUR.	53
ABBILDUNG 14. ACHT TAGE ALTE MAISPFLANZEN IN DER HYDROKULTUR.....	54
ABBILDUNG 15. KULTURSCHEMA DER PFLANZEN FÜR DIE PHÄNOTYPISIERUNG UND NITRATGEHALTBESTIMMUNG.	57
ABBILDUNG 16. KULTURSCHEMA DER FÜR DIE RNS-ISOLATION ANGEZOGENEN PFLANZEN.	57
ABBILDUNG 17. KULTURSCHEMA IM SANDSUBSTRAT MIT NÄHRSTOFFLÖSUNG.	59
ABBILDUNG 18. 18 TAGE ALTE MAISPFLANZEN IN SANDKULTUR BEI NIEDRIGER STICKSTOFFZUFUHR.....	60
ABBILDUNG 15. ÜBERSICHT DER VERWENDETEN GENOTYPEN IN DEN FELDVERSUCHEN UND IN DEN EXPERIMENTEN 1 BIS 4 DER GEFÄßVERSUCHE UNTER GEWÄCHSHAUSBEDINGUNGEN.....	70
ABBILDUNG 16. ERGEBNISSE DER MESSUNG DER ELEKTRISCHEN KAPAZITÄT DER WURZELSYSTEME BEI UNTERSCHIEDLICHER STICKSTOFFZUFUHR IM FELD.....	71
ABBILDUNG 17. ERGEBNISSE DER MESSUNG DER ELEKTRISCHEN KAPAZITÄT DER WURZELSYSTEME BEI NIEDRIGER STICKSTOFFZUFUHR IM GEFÄßVERSUCH UNTER GEWÄCHSHAUSBEDINGUNGEN.	73
ABBILDUNG 18. ERGEBNISSE DER BESTIMMUNG VERSCHIEDENER EIGENSCHAFTEN DER WURZELSYSTEME 3 WOCHEN ALTER MAISPFLANZEN IN SANDKULTUR BEI NIEDRIGER STICKSTOFFZUFUHR.	76
ABBILDUNG 19. DIE AUSBILDUNG DER KRON- UND STÜTZWURZELN BEI DEN ELTERNLINIEN SL UND TH IM FELD IN GRUCKING.	78
ABBILDUNG 20. KRON- UND STÜTZWURZELN VON LINIEN MIT UNTERSCHIEDLICHEN QTL-INTROGRESSIONEN UNTER HOHEN STICKSTOFFBEDINGUNGEN.....	79
ABBILDUNG 21. DIE KRON- UND STÜTZWURZELARCHITEKTUR VERSCHIEDENER GENOTYPEN UNTER NIEDRIGEN STICKSTOFFBEDINGUNGEN	80
ABBILDUNG 22. KRON- UND STÜTZWURZELARCHITEKTUR VON TESTKREUZUNGEN DER ELTERNLINIEN AM STANDORT BERNBURG.	81
ABBILDUNG 23. SICHTBARE WURZELN VON TESTKREUZUNGEN DIVERSENER MAISLINIEN.....	82
ABBILDUNG 24 GENOTYPEN DER LINIEN DER GROBKARTIERUNG DES STÜTZ- UND KRONWURZELPHÄNOTYPS.	83
ABBILDUNG 25. WURZELWINKEL DER ELTERNLINIEN UND NILS IN SANDKULTUR: EXPERIMENTE 1 UND 2.....	84
ABBILDUNG 26. WURZELWINKEL DER ELTERNLINIEN UND NILS IN SANDKULTUR: EXPERIMENT 3 UND 4.	85
ABBILDUNG 31. ÜBERSICHT ÜBER DIE GENOTYPEN FÜR DIE FEINKARTIERUNGSEXPERIMENTE 1, 2, 3 UND 4.....	87

ABBILDUNG 28. FEINKARTIERUNG DER KRONWURZELWINKEL: ZUSAMMENFASSUNG DER WERTE VON EXPERIMENT 1 UND 2.....	88
ABBILDUNG 29. FEINKARTIERUNG DER KRONWURZELWINKEL: ZUSAMMENFASSUNG DER WERTE VON EXPERIMENT 3 UND 4.....	90
ABBILDUNG 30. IM SANDVERSUCH FEINKARTIERTE ADULTE MAISLINIEN ZEIGEN AUCH AUF DEM FELDE UNTERSCHIEDE IN DER ARCHITEKTUR VON KRON- UND STÜTZWURZELN.....	92
ABBILDUNG 31. PRIMÄRWURZELN DREI WOCHEN ALTER PFLANZEN GEWACHSEN BEI NIEDRIGER STICKSTOFFZUFUHR SCHWIMMEND IM WASSER ABGEBILDET.....	94
ABBILDUNG 32. BESTIMMUNG DER PRIMÄRWURZELLÄNGE INSGESAMT UND SEPARAT FÜR LATERALWURZELN BZW. AXIALE PRIMÄRWURZEL.....	95
ABBILDUNG 33. VERGLEICH DER WURZELARCHITEKTUR 12 TAGE ALTER SÄMLINGE NACH ANZUCHT BEI NIEDRIGER STICKSTOFFZUFUHR.....	96
ABBILDUNG 34. REAKTION DER LATERALWURZELN AUF UNTERSCHIEDLICH HOHE NITRATKONZENTRATIONEN IM NÄHRMEDIUM.....	97
ABBILDUNG 35. PROZENTUALER GESAMTSTICKSTOFFGEGHALT IM SPROSS DER BEIDEN ELTERNLINIEN SL UND TH SIEBEN TAGE NACH DER ERSTEN NITRATZUGABE.....	98
ABBILDUNG 36. PROZENTUALER GESAMTSTICKSTOFFGEGHALT IN DEN WURZELN DER ELTERNLINIEN SL UND TH SIEBEN TAGE NACH DER ERSTEN NITRATZUGABE.....	99
ABBILDUNG 37. BERECHNETER STICKSTOFFNUTZEFFIZIENZ-INDEX FÜR DAS ANALYSIERTE SPROSSMATERIAL.....	101
ABBILDUNG 38. PCA DER NORMALISIERTEN WERTE DER EINZELEXPERIMENTE ZUM ZEITPUNKT 0 UND OHNE NITRATZUGABE.....	104
ABBILDUNG 39. PCA BEIDER ELTERN 28 H NACH DER ERSTEN NITRATZUFUHR.....	105
ABBILDUNG 40. ÜBERSICHT DER ERGEBNISSE DER CLUSTERANALYSE FÜR DEN ELTER SL.....	108
ABBILDUNG 41. ÜBERSICHT DER ERGEBNISSE DER CLUSTERANALYSE FÜR DEN ELTER TH.....	110
ABBILDUNG 42. ÜBERSICHT DER CLUSTERANALYSE DER DIFFERENTIELL EXPRESSENIERTEN GENE DES DIREKTEN VERGLEICHES VON TH UND SL ZU ALLEN ZEITPUNKTEN UND NITRATSTUFEN.....	113
ABBILDUNG 43 MITTELWERTE DER RPKM FÜR <i>NRT3</i> UND <i>NRT4</i> BEI VERSCHIEDENEN NITRATSTUFEN UND ZEITPUNKTEN.....	116
ABBILDUNG 44 MITTELWERTE DER RPKM FÜR <i>RTCL1</i> UND <i>RTCS1</i> ZU DEN VERSCHIEDENEN NITRATSTUFEN UND ZEITPUNKTEN.....	118
ABBILDUNG 45. GEDANKENEXPERIMENT ZUR BODENERSCHLIEßUNG MIT VERSCHIEDEN STEILEN WURZELAUSTRITTSWINKELN.....	123
ABBILDUNG 46. BERECHNETER STICKSTOFFNUTZEFFIZIENZ-INDEX FÜR DAS ANALYSIERTE WURZELMATERIAL.....	137
ABBILDUNG 48 ERGEBNISSE DER GENOTYPISIERUNG DER ELTERNLINIEN MIT DEM GENETISCHEN MARKER UMC1336.....	139
ABBILDUNG 49. ERGEBNISSE DER GENOTYPISIERUNG DER ELTERNLINIEN MIT DEM GENETISCHEN MARKER 164-44 P51/50.....	140
ABBILDUNG 50. PCA DER EINZELEXPERIMENTE DER LINIE TH.....	141
ABBILDUNG 51. PCA DER EINZELEXPERIMENTE DER LINIE SL.....	142

2 Tabellenverzeichnis

TABELLE 1 ÜBERSICHT ÜBER DIE VERWENDETEN SAATGUTCHARGEN	43
TABELLE 2 GESAMTÜBERSICHT ÜBER DIE IN DER HYDROKULTUR VERWENDETEN KONZENTRATIONEN VON MAKRO- UND MIKRONÄHRSTOFFEN.....	55
TABELLE 3 ÜBERSICHT DER RPKM MITTELWERTE FÜR IN DER LITERATUR BEKANNTE KANDIDATENGENE	115

3 Abkürzungen und Symbole

<i>Aqua dest.</i>	destilliertes Wasser
<i>Aqua demin.</i>	deionisiertes Wasser
α	gibt die Grenze eines Signifikanzniveaus an
BMFZ	Biologisch-Medizinisches Forschungszentrum-Düsseldorf
bp	Basenpaare
°C	Grad Celsius
cDNS	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cm	Zentimeter
d	Tag(e)
dATP	2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat
dCTP	2'-Desoxycytidin-5'-triphosphat
dGTP	2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphat
DH	doppelhaploid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	2'-Desoxynukleosid-5'-triphosphat

dsDNS	doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure
dTTP	2'-Desoxythymidin-5'-triphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EDDHA	Ethylendiamin-N,N'-bis(2-hydroxyphenyllessigsäure)Eisen ^{III} -Natrium-Komplex (C ₁₈ H ₁₆ FeN ₂ NaO ₆)
FW	Frischgewicht
h	Stunde(n)
HATS	physiologisch erfasstes hochaffines Transportsystem „high-affinity transport systems“
kb	Kilobase(n)
l	Liter
LATS	physiologisch erfasstes niederaffines Transportsystem „low-affinity transport system“
M	molar (mol/l)
m	Meter
μS/cm	Mikrosiemens je Zentimeter
Min.	Minute(n)
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	millimolar (millimol/l)
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
mRNS	„messenger“-Ribonukleinsäure

mV	Millivolt
nF	Nanofarad
ng	Nanogramm
NIL	nahe-isogene Linie
ns	nicht signifikant
p	gibt die prozentuale Irrtumswahrscheinlichkeit wieder
p.a.	für Analysezwecke
PCR	Polymerasekettenreaktion
QTL	„Quantitative Trait Locus“
RIN	„RNA Integrity Number“
RNS	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RPKM	„Reads Per Kilobase per Million mapped reads“
rRNS	ribosomale Nukleinsäure
<i>RTCL1</i>	<i>ROOTLESS CONCERNING CROWN AND SEMINAL ROOTS LIKE 1</i>
<i>RTCS1</i>	<i>ROOTLESS CONCERNING CROWN AND SEMINAL ROOTS 1</i>
s	Sekunde(n)
Sek.	Sekunde(n)
SL	kältesensitive und stickstoffnutzeffiziente Inzuchtlinie von <i>Zea mays</i>
Std.	Stunde(n)
subNIL	nahe-isogene Linie mit durch Rückkreuzung geschmälerter Introgression

TBE-Puffer	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TH	kältetolerante und stickstoffineffiziente Inzuchtlinie von <i>Zea mays</i>
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan
U	Enzymmenge, welche unter angegebenen Bedingungen ein Mikromol Substrat pro Minute umsetzt

4 Einleitung

4.1 Bedeutung der Nährstoffnutzeffizienz für die Landwirtschaft des 21. Jahrhunderts

Die Weltbevölkerung wächst seit Beginn des 20. Jahrhunderts nahezu ungebremst. Dem gegenüber steht die gleichzeitige Stagnation der landwirtschaftlich ökonomisch sinnvoll kultivierbaren Fläche. Im Zuge des Klimawandels ist sogar noch mit einer Minimierung dieser Flächen zu rechnen. Ein stetig steigender Meeresspiegel und sich immer mehr ausdehnende Wüsten führen zu einer weiteren Verschärfung der Nahrungsmittelknappheit. Die Milderung dieses Problems durch die Menschheit selbst ist eine der Herkulesaufgaben des 21. Jahrhunderts (Foley et al., 2011). Schon heute reichen die Errungenschaften der sogenannten Grünen Revolution des 20. Jahrhunderts nicht mehr aus, um den menschlichen Bedarf an Nahrungsmitteln vollständig zu decken (FAO).

Die Grüne Revolution führte zu einer deutlichen Ertragssteigerung wichtiger Kohlenhydrate liefernder Getreidearten. Durch die Erzeugung sogenannter kurzstrohiger Sorten mit einem verbesserten Verhältnis von Korn zu Stroh und der damit einhergehenden verbesserten Standfestigkeit kam es zu einer bis zu zweifachen Ertragssteigerungen (Curtis and Halford, 2014). Die Entwicklung der neuen Hochzuchtsorten mit stark auf den menschlichen Bedarf optimierten oberirdischen Pflanzenorganen erfolgte stets bei optimalen Bodenbedingungen und gleichzeitiger optimaler Nährstoffversorgung. Die enorme Ertragsleistung der modernen Sorten des 20. Jahrhunderts war und ist also gebunden an gleichbleibend optimale Bedingungen (Earl and Ausubel, 1983; Lynch and Brown, 2012; York et al., 2015). Schaut man sich die praktizierte Pflanzenselektion von Saatgutfirmen an, erfolgt die Bewertung neuer Hybriden und Sorten im Regelfall auf Böden mit höchsten Ackerwertzahlen (Lynch and Brown, 2012; Raun and Johnson, 1999). Über die Jahrhunderte ist sogar von einer unbewusst indirekten Selektion auf überdurchschnittlich nährstoffreiche Böden auszugehen (Hirel et al., 2001; York et al., 2015). Ertragseinbrüche moderner Hochleistungssorten unter suboptimalen Nährstoffbedingungen belegen dies

anschaulich. Kombiniert mit der Tatsache, dass die ausreichende Versorgung mit Nährstoffen ein erheblicher Kostenfaktor in der Landwirtschaft (Gewin, 2010; Raun and Johnson, 1999) und im Falle der Abbaustätten von Phosphor auch endlich ist, macht all dies ein Umdenken nötig (Lynch and Brown, 2012). Eine zweite Grüne Revolution ist zwingend notwendig (Lynch, 2007).

Während die erste Grüne Revolution ihr Hauptaugenmerk auf ein optimales Verhältnis von Ertrag zu oberirdischer Biomasse legte, blieb bis heute die Züchtung auf ein ebenso optimiertes Wurzelwerk auf der Strecke. Bedenkt man die eher niedrigere Bodenqualität auf den meisten Anbauflächen und insbesondere in den Entwicklungsländern, ist dies ein Missstand (Bishopp and Lynch, 2015). Wie groß der Einfluss von Wurzeln auf den Ertrag, die Ertragsqualität und auch das Wachstum von Pflanzen ist, zeigt die seit Jahrhunderten gartenbaulich praktizierte Methode des Veredelns. So lässt sich beispielsweise bei Apfelbäumen (*Malus*) die Endgröße des Baumes anhand der Wahl der Unterlage und damit des Wurzelwerkes bestimmen. Ein im Erwerbsanbau essentieller Faktor, wo alle Apfelsorten als ökonomische Spindelbäume gezogen werden. Ebenso haben die Unterlagen Einfluss auf die Fruchtgröße. Es ist üblich, für verschiedene Bodentypen die am besten angepasste Unterlage zu wählen (Ikinci, 2014). Der Einfluss der Unterlage lässt sich schon früh nach der Veredlung auch auf Ebene der Gentranskription zeigen (Jensen et al., 2003). Bei pflegebedürftigen Feldfrüchten wie Melonen (*Cucumis*) und Tomaten (*Solanum*) ist es längst gängige Praxis, jeweils separat sowohl auf optimale Eigenschaften von Früchten und Spross als auch auf beste Eigenschaften des Wurzelsystems zu selektieren. Anschließend werden beide Zuchtlinien oder Arten durch Pfropfen zu einer neuen Pflanze vereint, die nun die jeweilig besten Eigenschaften besitzt (Liu et al., 2011; Nilsen et al., 2014).

Studien an der Gartenbohne (*Phaseolus vulgaris*) zeigen, dass die Auslese auf ein perfekt dem Boden angepasstes Wurzelwerk zu deutlichen Ertragssteigerungen führen kann. Im Fall von *Phaseolus vulgaris* ist, wie bei allen *Fabaceae*, durch die Stickstofffixierung über Knöllchenbakterien der Pflanzennährstoff Phosphor der limitierte Faktor. Phosphate sind immobil und befinden sich vorrangig in der obersten Bodenschicht, weshalb prognostiziert wurde, dass insbesondere Genotypen mit einem flachen Wurzelsystem vorteilhaft sein sollten. Nach der Analyse vieler Genotypen und der Verifizierung der Bohnensorte mit dem flachsten Wurzelsystem, wurde diese

Eigenschaft in andere Sorten eingekreuzt, so dass Nachkommen mit deutlich erhöhten Erträgen auf Phosphatmangelböden erzielt werden konnten (Lynch and Brown, 2012). In einer weiteren Studie mit *Phaseolus* wurde ein flaches Wurzelsystem mit längeren Wurzelhaaren, einem weiteren in der Literatur zuträglichen Phänotyp bei Phosphatmangel, kombiniert. Die Kombination dieser beiden günstigen Phänotypen führte zu einer Steigerung der pflanzlichen Biomasse um 298 % bei Mangelbedingungen (Miguel et al., 2015). Der Erfolg dieser Studien zeigt sehr deutlich die Größe des Potentials, welches in der Optimierung von Wurzelsystemen liegt. Die Optimierung von Wurzelsystemen ist bisher bei den typischen Feldfrüchten nur marginal züchterisch ausgeschöpft worden (Bishopp and Lynch, 2015; Gewin, 2010). Damit liegt in der pflanzenzüchterischen Integration optimaler Wurzelsysteme in aktuelle Hochleistungssorten der wichtigsten Feldfrüchte wie Mais (*Zea mays* L.) das Potential für den nächsten Quantensprung in der Landwirtschaft: einer zweiten Grünen Revolution.

4.2 Stickstoff: essentiell für das Pflanzenwachstum, folgenswer für die Umwelt

Stickstoff ist einer der Makronährstoffe der Pflanze. Makronährstoff bedeutet, dass er den meisten Pflanzen in größerer Menge als andere essentielle Nährstoffe zur Verfügung stehen muss. Viele biochemische Bausteine der Pflanzen bestehen zu einem Großteil aus Stickstoffatomen, wie z. B. die Nuklein- und die Aminosäuren. Ohne Stickstoff ist kein pflanzliches Wachstum möglich. Stickstoffmangel zeigt sich bei Pflanzen schnell in Form von gelb gefärbten Blattbereichen mit einem Chlorophylldefizit, sogenannte Chlorosen, und Kümmerwuchs (O'Brien et al., 2016).

Stickstoff selbst kann von der Pflanze über die Wurzeln oder das Blatt aufgenommen werden. Einige wenige Pflanzenarten verfügen über Anpassungen und Strategien, um selbst an Standorten zu gedeihen, wo edaphisch Stickstoff nur unzureichend zur Verfügung steht (Glass et al., 2002; Nasholm et al., 1998; O'Brien et al., 2016). Eines der bekanntesten Beispiele ist die Symbiose von Leguminosen mit Rhizobien. Diese Bakterien ermöglichen eine Fixierung von Luftstickstoff für die Pflanze (Nazariuk et al., 2006). Diese biologische Stickstoffzufuhr hatte vor der Entwicklung des Haber-Bosch-

Verfahrens eine große agronomische Bedeutung (Hirsch and Mauchline, 2015). Doch nur wenige Pflanzenarten sind in der Lage, durch die Symbiose mit Rhizobien oder Cyanobakterien den reichlich vorhandenen Luftstickstoff nutzbar zu machen.

Bei Landpflanzen erfolgt die Aufnahme von stickstoffhaltigen Verbindungen in der Regel über die Wurzel. Daher sind die Pflanzen also abhängig vom im Boden vorhandenen Stickstoff. Stickstoff wird von der Pflanze meist in ionischer Form als Nitrat (NO_3^-) oder Ammonium (NH_4^+) aufgenommen (Glass et al., 2002; O'Brien et al., 2016). Bei einigen Pflanzenarten ist es auch im Laufe der Evolution zu einer Spezialisierung auf eine der beiden Ionenarten gekommen (Glass et al., 2002).

Im Gegensatz zu Phosphor ist Stickstoff im Boden in seiner ionischen Form mobil und wird so schnell durch Regenwasser in tiefere Erdschichten ausgewaschen. Aufgrund der Mobilität der Ionen gelangt ein großer Teil des vom Landwirt ausgebrachten Stickstoffdüngers schnell ins Grundwasser und in naheliegende Gewässer (Lynch and Brown, 2012). Die Herstellung von stickstoffhaltigen Düngemitteln ist durch das Haber-Bosch-Verfahren zwar nahezu unbegrenzt möglich, aber mit einem hohen Energie- und damit auch Kostenaufwand verbunden. Eine weitere Problematik des massiven Gebrauchs von Stickstoffdünger stellen Umweltschäden dar. Durch den übermäßigen Stickstoffeintrag kommt es in den betroffenen Gewässern zu Algenblüten, auf die wiederum weitere Reaktionen wie Fischsterben folgen (Gewin, 2010; Quan et al., 2016; Weyer et al., 2001). Die durch den hohen Stickstoffeintrag erhöhte Denitrifikation resultiert in einer verstärkten Bildung von Distickstoffmonoxid (N_2O). Distickstoffmonoxid ist ein klimaschädliches Gas (Schlesinger, 2009). Der massive Einsatz von Stickstoffdünger kann also global gesehen zu einer Verringerung von fruchtbarem Ackerland führen. Im Grundwasser selbst ist Nitrat auch schädlich für den Menschen und muss aufwendig während der Trinkwasseraufbereitung entfernt werden (Weyer et al., 2001). Die hohen Kosten führen zu einem Umdenken und neuen Richtlinien in der Landwirtschaft, welche sich wiederum auf die Zuchtziele auch bei Mais auswirken (Gallais A., 2008; Presterl et al., 2003).

4.2.1 Nitrat als Nährstoff und seine Wirkung auf die Pflanze im Boden

Der Aufbau von Proteinen und vielen weiteren Stoffen in Pflanzen setzt eine Stickstoffquelle voraus. Die Hauptaufnahmeform von Stickstoff durch Nutzpflanzen ist Nitrat (NO_3^-), weshalb in der Landwirtschaft Stickstoffdünger auf Basis von nitrathaltigen Salzen verwendet wird. Die aus den Salzen hervorgehenden Ionen sickern mit dem Regenwasser in den Boden. Dort gelangt das Nitrat an die Pflanzenwurzeln, den Ort der Aufnahme durch die Pflanzen (Raun and Johnson, 1999).

Nitrat ist für die Pflanze aber nicht nur ein Makronährstoff, sondern auch Botenstoff: Bei der Ackerschmalwand (*Arabidopsis thaliana* L.) wurde der Einfluss von Nitrat auf die Keimungsrate der Nachkommen gezeigt (Chopin et al., 2007). Daneben wirken auch äußere Nitratkonzentrationen auf die Keimung der Ackerschmalwand (Osuna et al., 2015).

Nitrat wirkt auch als Botenstoff auf die Wurzelarchitektur und initiiert die Ausbildung von Lateralwurzeln (Lopez-Bucio et al., 2003; Zhang et al., 1999). Es gibt zahlreiche Studien für Zusammenhänge zwischen der Ausbildung des Wurzelsystems und den edaphischen Nährstoffverhältnissen (Giehl et al., 2014; Lopez-Bucio et al., 2003). Nitrat bewirkt eine stärkere Elongation von Lateralwurzeln. Ammonium, eine weitere Form der Stickstoffaufnahme, fördert hingegen die Initiierung weiterer Lateralwurzeln (Giehl et al., 2014). So konnte für *Arabidopsis* eine verstärkte Bildung weiterer Lateralwurzeln sowohl erster als auch zweiter Ordnung durch lokale Ammoniumzufuhr gezeigt werden (Lima et al., 2010).

4.2.2 Aktive Stickstoffaufnahme in der Wurzel auf molekularer Ebene durch Transportsysteme

Der radiale Transport der Nährstoffionen durch die Wurzel erfolgt auf zwei Möglichkeiten: apoplastisch und symplastisch. Erstere Transportmöglichkeit geschieht passiv im apoplastischen Raum, d.h. entlang der pflanzlichen Zellwände im apoplastischen Raum (Glass et al., 2002). Der apoplastische Transport der Nitrationen mit dem Wasserstrom folgt dem Konzentrationsgefälle innerhalb der Wurzel von der

Rhizodermis (Abbildung 1 a) über die Exodermis (Abbildung 1 b) und das Rindenparenchym (Abbildung 1 c) bis zur Endodermis (Abbildung 1 d), wo er am Casparischen Streifen (Abbildung 1 e) endet. Dieser einschichtige Zellstreifen bildet eine physiologische Scheide in Form einer wasserundurchlässigen Barriere aus Endodermin. Dort findet der Wechsel zum symplastischen und damit selektiven Transport durch die lebenden Zellbestandteile statt. Nitrationen können aber auch direkt durch aktiven gesteuerten Transport an der Kontaktstelle von Boden und Wurzeloberfläche über Spezifische Nitrattransporter in die Zellen aufgenommen und dann direkt von Beginn an symplastisch ins Wurzelzentrum transportiert werden (Glass et al., 2002; O'Brien et al., 2016). Die Hauptrolle bei der aktiven und passiven Aufnahme von Nährstoffen und Wasser spielen die Wurzelhaare - Ausstülpungen der Rhizodermis, welche die Wurzeloberfläche erhöhen (Hochholdinger et al., 2008; Meharg and Blatt, 1995; Parker et al., 2000) .

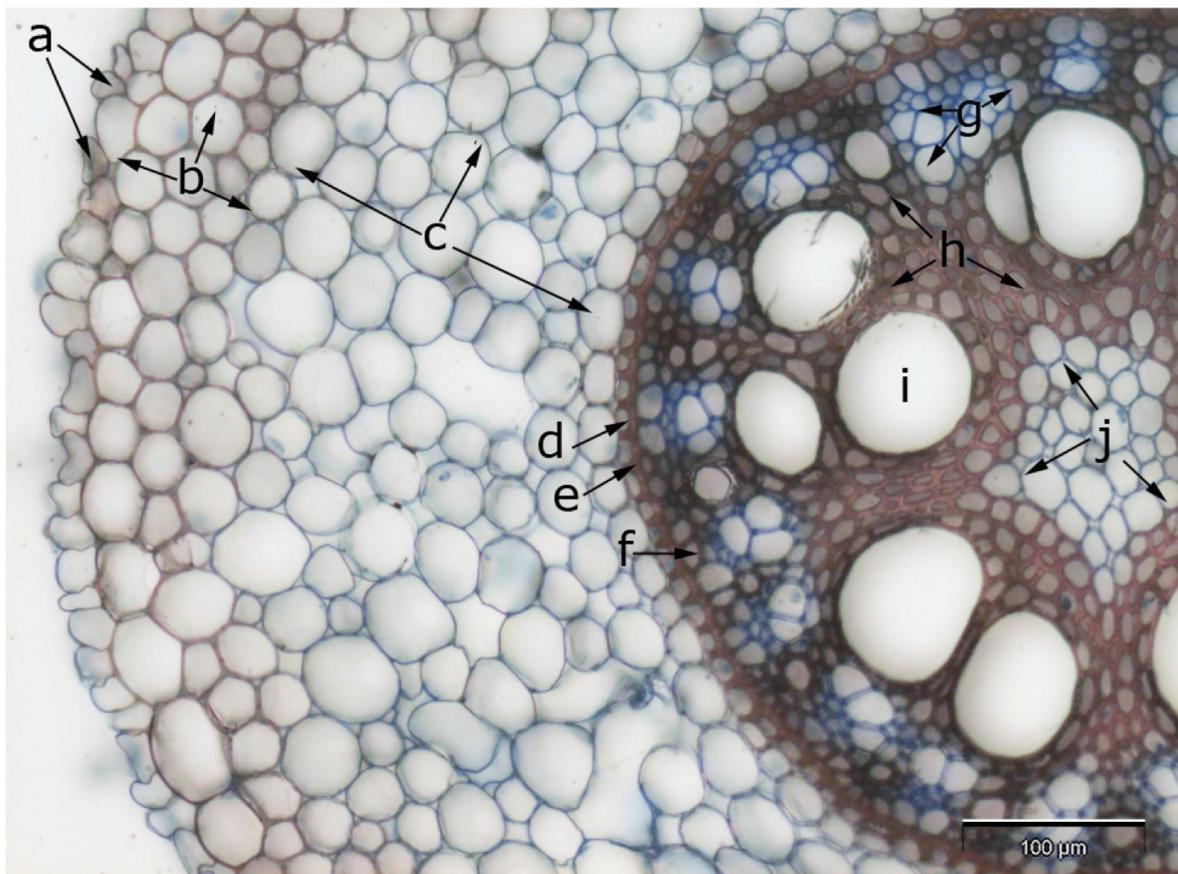


Abbildung 1. Querschnitt durch die Primärwurzel einer Maispflanze nach 25 Tagen Wachstum.

Der Querschnitt wurde mit Lactoglycerin blau behandelt, welches proteinreiche Regionen blau anfärbt. a: Rhizodermis, b: Exodermis (rötlich), c: Rindenparenchym (bläulich), d: tertiäre Endodermis (rötlich), e:

Casparyscher Streifen (rötlich), f: Perizykel (rötlich), g: Phloem (bläulich), h: Xylem (rötlich), i: Trachee (rötlich), j: Markparenchym (bläulich) (Wever, 2010).

Von größter Bedeutung für die Aufnahme von Nitrationen ist der aktive Transport über die Plasmamembran, der gekoppelt an einen H^+ -Gradienten durch in der Plasmamembran befindliche H^+ -ATPasen aufgebaut wird, wie dies in *Arabidopsis thaliana* nachgewiesen werden konnte (Meharg and Blatt, 1995). Für den aktiven Symport von einem Nitration und zwei Protonen wurden drei mögliche Aufnahmesysteme in Pflanzen identifiziert: ein niederaffines Transportsystem, „low-affinity transport system“ (LATS), und zwei hochaffine Transportsysteme, „high-affinity transport systems“ (HATS) (Crawford, 1998; Glass et al., 2002). Eines der hochaffinen Transportsysteme ist konstitutiv aktiv (cHATS) und das andere durch Nitrationsanwesenheit induzierbar (iHATS). cHATS zeigen schon ohne Nitrationszugabe Aktivität und ihre Regulation ist unklar (Kronzucker et al., 1995). Nitratmetabolite wie Ammonium und Aminosäuren wirken auf die möglichen iHATS hingegen reprimierend (Kronzucker et al., 1999a; Kronzucker et al., 1999b; Zhuo et al., 1999). Bei Nitrationskonzentrationen von 0 bis 0,5 mM (Crawford, 1998) bzw. 0 bis 0,2 mM (Aslam et al., 1992) sind in Gerste (*Hordeum vulgare* L.) beide HATS aktiv. cHATS und iHATS unterscheiden sich durch ihre K_m -Werte, die von 6 bis 20 μM (cHATS) bzw. 20 bis 100 μM (iHATS) reichen, und durch die Induzierbarkeit letzterer bei niedrigen Nitrationskonzentrationen (Crawford, 1998). cHATS haben eine höhere Affinität für Nitrationen, wohingegen iHATS aufgrund ihres V_{max} -Wertes, erst deutlich später eine Sättigung zeigen (Kronzucker et al., 1995; Siddiqi et al., 1990).

Steigt die äußere Nitrationskonzentration über 1 mM, übernimmt das LATS die Nitrataufnahme (Glass et al., 2002; Siddiqi et al., 1990). Eine Sättigung des LATS findet ab einer äußeren Nitrationskonzentration von 50 mM statt (Orsel et al., 2002). Als eine mögliche Regulierung für die Aktivität des LATS gilt die äußere Nitrationskonzentration. Bei einigen Pflanzenspezies konnte eine Hemmung des LATS durch Nitrationszugabe nachgewiesen werden (Kronzucker et al., 1995). Einige Autoren konnten zeigen, dass auch bei den LATS zwischen induzierbaren und konstitutiven Transportern unterschieden werden kann (Tsay et al., 2007).

Insbesondere in *Arabidopsis thaliana* wurden Gene gefunden, die verschiedene Nitrattransporter (NRTs) der beschriebenen Transportsysteme kodieren. Die *NRT*-Gene

können aufgrund der abgeleiteten Aminosäuresequenzen in 2 Multigenfamilien unterteilt werden: *NRT1* und *NRT2* (Tsay et al., 2007). In *Arabidopsis* wurden anhand von Sequenzvergleichen 53 Mitglieder der *NRT1*- und 7 der *NRT2*-Familie identifiziert (Orsel et al., 2002), welche wahrscheinlich durch Gen- und/oder Genomduplikationen entstanden sind und im Laufe der Evolution verschiedene Funktionen übernommen haben. Beispielsweise wird *NRT2.1* spezifisch in der Wurzel von *Arabidopsis thaliana* exprimiert, *NRT2.7* dagegen fast ausschließlich in Samen (trocken und gequollen) und Blättern von *Arabidopsis* (Chopin et al., 2007). Auch für die *NRT1*-Genfamilie gibt es Beobachtungen, die darauf hinweisen, dass sie auch in anderen Zelltypen als der Wurzel aktiv ist (Plett et al., 2010; Tsay et al., 2007).

Aufgrund der geringen Informationen über beide Genfamilien, die meist nur auf Sequenzvergleichen beruhen, ist eine jeweilige Zuordnung zu den verschiedenen Transportsystemen nicht immer eindeutig möglich. Es gibt vermehrt Hinweise darauf, dass die HATS der *NRT2*- und die LATS der *NRT1*-Familie zugeordnet werden können (Orsel et al., 2002; Plett et al., 2010; Wang et al., 1998). Für *NRT1.1* ist bekannt, dass er ambivalent agieren kann (Wang et al., 1998). Für 2 *NRT2*-Mutanten bei *Arabidopsis thaliana* konnte nachgewiesen werden, dass einzelne Wurzelzellen der mutanten Pflanzen im Gegensatz zu den wildtypischen Wurzelzellen keine Reaktion bei 0,25 mM äußeren Nitrationenkonzentrationen zeigten, wohingegen bei 10 mM Nitrationen beide Genotypen gleich reagierten (Wang and Crawford, 1996). Einzelne *NRT*-Gene können nicht immer eindeutig den beiden HATS (cHATS und iHATS) zugeordnet werden. So wird *NRT2.1* bei *Zea mays* von Trevisan et al. (2008) beiden Systemen zugeordnet. Eine weitere Genfamilie stellen die *NRT3*-Gene dar. Diese sind allerdings nicht aktiv am Transport der Nitrationen beteiligt sondern dienen der Regulation der Aktivität der *NRT2*-Familie. Bei *Arabidopsis* sind zwei *NRT3*-Gene bekannt (Okamoto et al., 2006).

4.3 Das Wurzelsystem und dessen genetische Regulierung bei *Zea mays*

4.3.1 Die homorhize Wurzelarchitektur der *Poaceae Zea mays*

Die Wurzeln der Pflanzen können verschiedenartige Aufgaben haben, wobei sie in der Regel der Verankerung im Bodengrund sowie der Aufnahme von Nährstoffen aus dem Boden dienen. Mit Abstand am intensivsten ist die Wurzelbildung und -entwicklung bei *Arabidopsis thaliana* studiert wurden (Petricka et al., 2012). *Zea mays* besitzt gegenüber dem allorhizen Wurzelsystem von *Arabidopsis* ein homorhizes Wurzelsystem. Bei dieser speziellen Form von Wurzelsystem dominiert nicht die embryonal angelegte Primärwurzel während der ganzen Entwicklungszeit. Bei einem homorhizen Wurzelsystem bilden sich im Laufe der Entwicklung weitere meist sprossbürtige und in der Ausdehnung gleichberechtigte oder sogar dominierende Wurzeln aus. Teilweise wird die Primärwurzel im Laufe der Entwicklung abgebaut und durch die neu gebildeten Wurzeln ersetzt. Dieser Aufbau des Wurzelsystems und die endogene Anlage von Primärwurzel und Seminalwurzeln ist typisch für die Familie der *Poaceae*, zu der neben den Getreiden Weizen und Reis auch Mais gehört (Pages and Picon-Cochard, 2014). Die Skizze in der Abbildung 2 gibt den beschriebenen Aufbau des Wurzelsystems von *Zea mays* wieder.

Bei *Zea mays* wird zuerst die Primärwurzel (auch Keimwurzel genannt) sichtbar und übernimmt die erste Verankerung und Versorgung des Keimlings im Boden (Hochholdinger and Tuberosa, 2009). Wenige Tage später werden die ebenfalls embryonal angelegten Seminalwurzeln erkennbar. Beide Wurzeltypen zusammen werden als primäres oder embryonales Wurzelsystem bezeichnet.

Dem gegenüber steht ein postembryonales, auch als sekundäres bezeichnetes, sprossbürtiges Wurzelsystem. Es setzt sich aus den unterirdisch liegenden Kronwurzeln und den oberirdisch entspringenden Stützwurzeln zusammen. Beide entstehen aus den Nodien und unterscheiden sich nur durch die Lage, ihre Entstehung ist genetisch aber identisch reguliert (Hochholdinger et al., 2004). Während die embryonal angelegten Wurzeln für die anfängliche Etablierung der Maispflanze sorgen, dient das sprossbürtige Wurzelsystem vor allem der späteren Ernährung und beeinflusst damit auch den Ertrag (Hochholdinger and Tuberosa, 2009). Alle Wurzeltypen von Mais bilden Lateralwurzeln

aus, die auch postembryonal entstehen. Nur die Bereiche der Stützwurzeln, die sich oberirdisch befinden, unterlassen dies. Erst durch den Erdkontakt kommt es zu einer Ausbildung von Lateralwurzeln an den Stützwurzeln (Hochholdinger et al., 2004). Wie bei anderen Nutzpflanzen sind die auch bei Mais vorhandenen sogenannten Wurzelhaare die biologische Stellschraube, welche zu wesentlich größeren Oberflächen führt und wo der Großteil der Aufnahme von Wasser sowie Nährstoffen stattfindet. Diese Ausstülpungen der Rhizodermis können im ganzen Wurzelsystem auf den unterschiedlichsten Wurzeltypen ausgebildet werden (Parker et al., 2000; Wen et al., 2005).

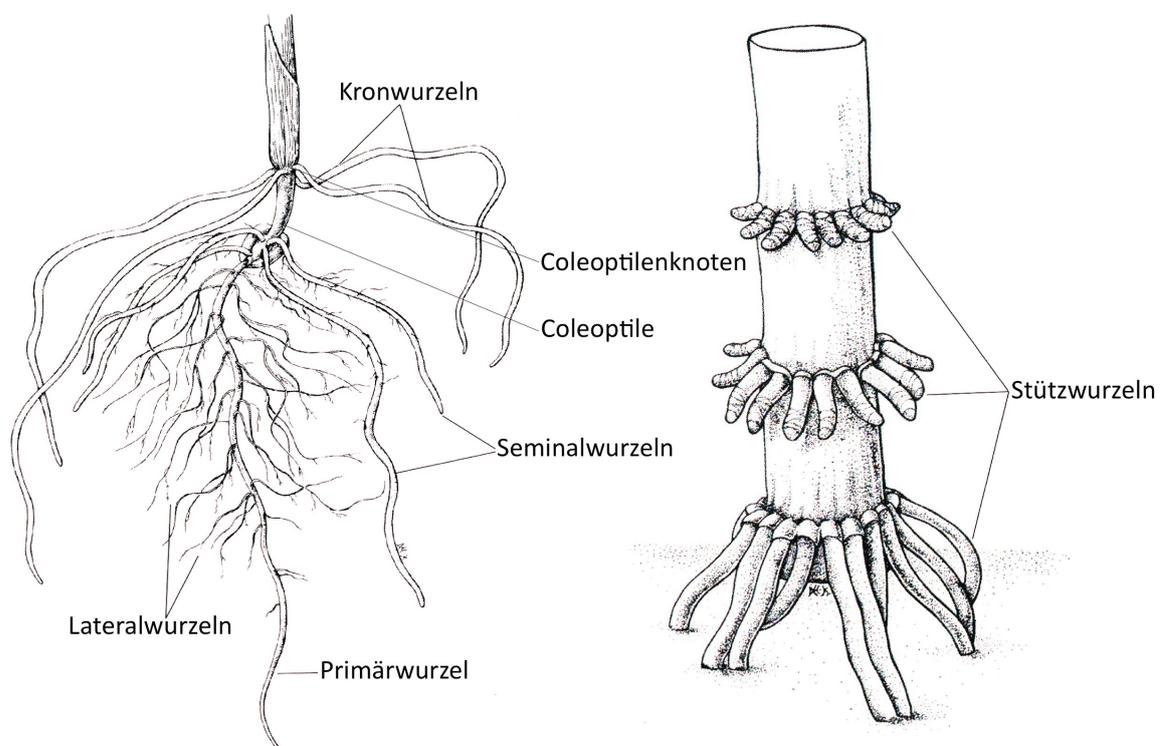


Abbildung 2. Das homorhize Wurzelsystem von Mais.

Die Abbildung zeigt eine Skizze, welche die homorhize Wurzelsystementwicklung darstellt. Die links dargestellte Jungpflanze zeigt die typischen embryonal angelegten Wurzeln: die Primärwurzel und Seminalwurzeln. Gleichzeitig sind im skizzierten Entwicklungszustand die am Coleoptilenknoten entspringenden ersten 4 Kronwurzeln zu sehen. Rechts sind die oberirdischen Anlagen des sprossbürtigen Teils des Wurzelsystems zu sehen. Die Stützwurzeln entspringen ringförmig aus den unteren Sprossnodien. Abgewandelt von Hochholdinger (Hochholdinger, 2009).

4.3.2 Genetische Regulation der Wurzelarchitektur bei *Zea mays*

Die Entwicklung der Wurzeln ist, wie bei *Arabidopsis* (Galinha et al., 2007; Peret et al., 2009), auch bei *Zea mays* genetisch geregelt. Allerdings sind im direkten Vergleich zu *Arabidopsis* bei *Zea* nur wenige Gene und Mutanten hierzu bekannt. Wie im Kapitel 4.3.1 beschrieben unterscheiden sich bei Arten grundsätzlich in ihrer Wurzelarchitektur und Mais bildet mehrere gleichberechtigte Hauptwurzeln aus.

Primär-, Seminal- und Kronwurzelentwicklung

Die Mutante *rtcs* (*rootless concerning crown and seminal roots*) bildet eine vollständige Primärwurzel inklusive Lateralwurzeln aus, die Seminalwurzeln und alle postembryonalen Wurzeltypen fehlen aber. Auch Primordien sind für diese Wurzeltypen nicht nachweisbar (Hetz, 1996; Taramino et al., 2007). Das *RTCS*-Gen liegt auf dem Chromosom 1 und ein im Laufe der Evolution durch Duplikation entstandenes Homolog *RTCS-LIKE* befindet sich auf Chromosom 9. Aufgrund bioinformatischer Abgleiche wird vermutet, dass beide Homologe durch das Pflanzenhormon Auxin gesteuert werden. Neben der gestörten Entwicklung weiterer Hauptwurzeln außer der Primärwurzel, konnte in Experimenten auch ein Einfluss auf die gravitrope Reaktion der Primärwurzel gezeigt werden (Taramino et al., 2007). Einen ähnlichen Phänotyp, wie für die Mutante *rtcs* beschrieben, zeigt die Mutante *rootless1*, welche ebenfalls auf die Ausbildung der Kron- und Stützwurzeln wirkt. Im Unterschied zu *rtcs* kommt es bei *rootless1* zu einer Reduktion der Anzahl der Kronwurzeln der ersten beiden Nodien und zu einem völligen Verlust aller sprossbürtigen Wurzeln ab dem dritten Nodium (Jenkins, 1930).

Mit der Mutante *rum1-R* (*rootless with undetectable meristems 1-Reference*) wurde ein für die Bildung der Seminalwurzeln essentielles Gen gefunden. Die mutanten Maispflanzen zeigen keine Seminalwurzeln. Zusätzlich bilden die Primärwurzel dieser Mutanten keine Lateralwurzeln aus. *RUM1-R* liegt auf Chromosom 3. Über Sequenzvergleiche wurde ein von der Basensequenz ähnliches Gen *RUM1LIKE1* auf Chromosom 8 gefunden (von Behrens I., 2011).

Lateralwurzelentwicklung

Für die Entwicklung von Lateralwurzeln sind bei Mais drei Mutanten bekannt: *lateral rootless1 (lrt1)*, *short lateral roots1 (slr1)* und *short lateral roots2 (slr2)* (Hochholdinger and Feix, 1998; Hochholdinger et al., 2001). Die gefundene Mutation in LTR1 führt dazu, dass mutante Pflanzen keine oder verzögert Lateralwurzeln an Primär-, Seminal- und Kronwurzeln des Coleoptilenknotens bilden (Hochholdinger and Feix, 1998). Neuere Studien zeigen auch eine Abhängigkeit des zu beobachtenden Phänotyps und der Kulturmethode auf (Husakova et al., 2013). Beide *SLR*-Gene wirken auf das Längenwachstum der Seitenwurzeln bei Primär-, Seminal- und frühen Kronwurzeln, welches bei den Mutanten verringert ist (Hochholdinger et al., 2001).

Wurzelhaare

Die Bildung von Wurzelhaaren ist genetisch sehr komplex. In *Arabidopsis* wurde ein Zusammenspiel mehrerer Gene aufgedeckt (Bruex et al., 2012). Für die genetische Steuerung der Bildung und Entwicklung von Wurzelhaaren sind 6 Mutanten bei Mais bekannt: *disorganized aleurone layer1*, *disorganized aleurone layer2*, *roothairless1*, *roothairless2*, *roothairless3* und *roothairless5* (Lid et al., 2004; Nestler et al., 2014; Wen et al., 2005; Wen and Schnable, 1994). *Roothairless1* weist eine geminderte Wurzelhaarelongation bereits angelegter Wurzelhaare gegenüber dem Wildtyp auf. Der Locus des betroffenen Gens befindet sich auf Chromosom 1 (Wen et al., 2005). *Roothairless2* führt zu einem ähnlichen Phänotyp, allerdings wachsen hier die Wurzelhaare minimal aus (Wen and Schnable, 1994). *Roothairless3* führt ebenfalls zur generellen Stagnation bereits angelegter Wurzelhaare. Phänotypisch ist *roothairless3* *roothairless1* ähnlich. Das Gen *ROOTHAIRLESS3* befindet sich auf Chromosom 1 (Wen and Schnable, 1994). Es konnte die physiologische Bedeutung von *ROOTHAIRLESS3* für den Kornertrag *in situ* gezeigt werden. Die Mutation und damit die Beeinträchtigung der Wurzelhaarbildung führte zu einem signifikanten Rückgang des Ertrages (Hochholdinger et al., 2008). Für *roothairless5* wurde eine um 64 % reduzierte Dichte der Wurzelhaare festgestellt, auch die Länge der Wurzelhaare betrug nur 4 % von der des Wildtyps. *ROOTHAIRLESS5* konnte auf Chromosom 3 lokalisiert werden (Nestler et al., 2014). Des Weiteren wurden bezüglich der genetischen Regulierung der Wurzelhaarbildung aberrante Effekte für Wurzelhaare und die Anzahl von

Wurzelhaaren bei den Maismutanten *dil1* und *dil2* (*disorganized aleurone layer*) gefunden (Lid et al., 2004).

4.4 Optimierung der Maiswurzelarchitektur für Nitratmangelbedingungen

Sehr intensiv mit der Thematik der Optimierung von Wurzelarchitektur, sowohl theoretisch als auch praktisch, hat sich Lynch beschäftigt (Lynch, 2007; Lynch, 2011, 2013; Lynch and Brown, 2012; Postma and Lynch, 2011). Mit den Schlagwörtern „steil, billig und tief“ gibt er die aus seiner Sicht wichtigsten Eigenschaften für den Idealtyp eines für Stickstoffaufnahme optimierten Wurzelsystems an. Mit „steil“ nimmt Lynch Bezug auf die Winkel der Wurzeln, mit denen diese von der Pflanze in den Boden auswachsen. Diese Steilheit ist wichtig, um möglichst tiefe Bodenschichten zu erreichen, wo es wahrscheinlicher ist, den mobilen Nährstoff Nitrat vorzufinden (Lynch, 2013). Die Korrelation zwischen steileren Wurzelwinkeln und dem Erreichen tieferer Erdschichten wurde schon vielfältig dokumentiert (Bonser et al., 1996; Hund et al., 2011; Trachsel et al., 2013). Allerdings ist zu bedenken, dass die an für sich schon inhomogene Verteilung von Nährstoffen auch abhängig von der Art der agrarischen Bewirtschaftung ist. So kommt es insbesondere bei ökologisch bewirtschafteten Äckern zu einer Anreicherung von Stickstoff in den oberen Bodenschichten (Poudel et al., 2001). Für die Seminalwurzeln sieht Lynch zwei Möglichkeiten: Sie könnten flach oder steil in die Erde wachsen, je nach dem Verhalten der späteren Kronwurzeln. Nicht außer Acht gelassen werden sollte, dass die Seminalwurzeln noch zusammen mit der Primärwurzel agieren und es somit bei flachen Seminalwurzeln zu einer besseren Erschließung des Bodens insgesamt kommt (Lynch, 2013).

Essentiell für eine stickstoffeffiziente Wurzelarchitektur hinsichtlich des Ertrages ist der Aufbau des postembryonalen Wurzelsystems. Kron- und Stützwurzeln sind hauptverantwortlich für die späte Entwicklungsperiode der Maispflanze (Hochholdinger and Tuberosa, 2009; Lynch, 2013). Für die Anzahl der Kronwurzeln wird eine mittlere Menge im Rahmen von 5–50 unter Feldbedingungen vorgeschlagen, da eine größere Anzahl nur weitere Kosten bezüglich der Ernährung dieser verursachen würde, bei gleichzeitiger Konkurrenz der Kronwurzeln untereinander (Lynch, 2013; Saengwilai et al., 2014; Trachsel, 2011). Diese Eigenkonkurrenz käme vor allem durch die geforderten

steilen Winkel zustande. Zu wenige Kronwurzeln wiederum würden das Risiko erhöhen, bei beispielsweise Pathogenbefall zu wenige Wurzeln zu besitzen (Lynch, 2013). Für die Stützwurzeln wird angeführt, dass es vorteilhaft wäre, wenn sich diese am ersten Nodium bilden, um ein möglichst vollständiges Eintauchen der Wurzeln ins Erdreich zu erreichen (Lynch, 2013).

Um möglichst „billige“ (Lynch, 2013) Wurzeln zu erzeugen, ist es günstig, wenn der Durchmesser der Wurzeln aller Typen möglichst dünn ist. Dem gegenüber stehen die Beobachtungen bei Reis, dass Wurzeln mit größeren Durchmessern aufgrund der Steifheit besser tiefere Bodenschichten erreichen können (Clark et al., 2008), weshalb Lynch geringe Wurzeldurchmesser bei Wurzeln mit flacher Orientierung als Lösung sieht (Lynch, 2013). Eine weitere Möglichkeit für Wurzelsysteme mit einem geringeren Grundumsatz und damit höheren Ertragsmöglichkeiten, ist die Ausbildung eines speziellen Durchlüftungsgewebe, eines sogenannten Aerenchyms (Saengwilai et al., 2014; Zhu et al., 2010). Berechnungen durch Postma und Lynch anhand von Modellierungen mit dem Programm *SimRoot* sagen ein Potential um bis zu 55 % verbessertes Wachstum unter Stickstoffmangelbedingungen für 40 Tage alte Maispflanzen voraus, welche verstärkt Wurzeln mit Aerenchym im Wurzelcortex bilden (Postma and Lynch, 2011).

Lateralwurzeln sind aufgrund ihrer Größe eine im Verhältnis zu den Hauptwurzeln physiologisch gesehen preiswerte Möglichkeit, mehr Bodenvolumen zu erschließen (Zhu and Lynch, 2004). Trotz geringer Gesamtmasse können sie einen Großteil der Gesamtwurzeloberfläche ausmachen (Postma et al., 2014). Für Phosphatmangel wurde gezeigt, dass neben einer erhöhten Dichte und Länge von Wurzelhaaren (Gahoonia et al., 1999), eine hohe Anzahl von Lateralwurzeln in oberen Bodenschichten die Effizienz von Wurzelsystemen erhöht (Paszkowski and Boller, 2002; Zhu and Lynch, 2004). Für stickstoffarme Böden postuliert Lynch dagegen mehr Effektivität durch weniger und dafür längere Lateralwurzeln bei möglichst steilen Kron- bzw. Stützwurzel, da diese bei gleicher Gesamtlänge fähig wären, ein größeres Erdvolumen zu erschließen (Lynch, 2013). Diese These wird unterstützt durch die Ergebnisse der *SimRoot*-Simulationen von Postma (Postma et al., 2014).

4.4.1 Definition der Stickstoffnutzeffizienz für die analysierten Maispflanzen

Stickstoffnutzeffizienz von Pflanzen wird in der Literatur unterschiedlich definiert und auch bewertet und ist abhängig davon, welcher Teil der pflanzlichen Entwicklung betrachtet wird (Chardon et al., 2012; Good et al., 2004). Ein effizienterer Umgang der Maispflanze mit dem verfügbaren Stickstoff kann auf verschiedene Arten erreicht werden: der effizienteren Aufnahme von Stickstoff (Lynch, 2013; York et al., 2016), der Verwertung des aufgenommenen Stickstoffs (Hirel et al., 2001) und bei Körnermais auch durch die Remobilisierung des Stickstoffs aus der seneszenten Pflanze selbst bei der Füllung der Körner (Gallais and Hirel, 2004; Hirel et al., 2001). Eine der gängigsten Definitionen für Stickstoffnutzeffizienz von Körnermais ist die von Korntrag pro Einheit bodenverfügbares Nitrat (Chardon et al., 2012; Good et al., 2004; Moll et al., 1987). Für die pflanzliche Biomasse wird dagegen oft das Verhältnis von Biomasse (frisch oder trocken) zum Stickstoffgehalt als Sticknutzeffizienz-Index definiert (Chardon et al., 2012; Good et al., 2004; Pestsova et al., 2016). Diese Definitionen wurden als Orientierungslinie für die hier vorgenommenen Bewertungen der Stickstoffnutzeffizienz verwendet.

4.5 Loci für quantitative Eigenschaften

Quantitative Merkmale sind gegenüber den distinkten nicht scharf voneinander abgrenzbar. So ist die Farbe einer Blüte ein diskretes Merkmal, wenn sie aufgrund des genetischen Hintergrundes entweder rot oder weiß sein kann. Es gibt aber auch den Fall, dass die Nachkommen einen neuen Phänotyp oder Kombinationen aus Phänotypen zeigen (Geldermann, 1975; Paterson, 1995). Die unterschiedlichen Ausprägungen dieses Phänotyps sind darin begründet, dass, im Fall eines quantitativen Merkmals, dieses Merkmal auf einem komplexen Zusammenspiel verschiedener Gene beruht und sich nicht auf ein einziges Gen zurückführen lässt (Darvasi, 1998; Geldermann, 1975). Für polygene Merkmale wie Stickstoffnutzeffizienz ist die Berechnung von „Quantitative Trait Loci“ (QTLs) eine aussichtsreiche Methode (Mackay, 2001). Ein QTL ist eine Chromosomenregion, wo sich ein oder mehrere Gene befinden, die für ein quantitatives Merkmal bei einem Lebewesen verantwortlich sind.

Eines der bekanntesten und ersten Beispiele für die Nachverfolgung von Merkmalen quantitativer Natur und mit Hilfe von Markern sind die Untersuchungen von Sax. Er stellte anhand von der Beobachtung der Vererbung von Samenschalenfarbe, -musterung und -gewicht bei *Phaseolus vulgaris* Assoziationen in der Weitergabe der drei Merkmale fest (Sax, 1923). Gleichzeitig hat Sax damit auch gezeigt, dass es notwendig ist, Marker zu besitzen, mit denen genetische wie auch phänotypische Eigenschaften verfolgt werden können. Sax dienten rein morphologische Marker (Phänotyp). Heute stehen aber stattdessen genetische Marker zur Verfügung welche ein essentielles Werkzeug für die konkrete genetische Berechnung und Kartierung von QTLs darstellen. Schon früh wurde erkannt, dass für die Präzision der Berechnung der Lage auf den Chromosomen die Anzahl an genetischen Markern eine entscheidende Rolle spielt (Paterson, 1995).

4.5.1 Quantitative Eigenschaften und deren Bedeutung in der Pflanzenzüchtung

Viele phänotypische Eigenschaften bei Nutzpflanzen sind quantitativer Natur. So ist der Ertrag von Nutzpflanzen, der im ständigen Fokus des Pflanzenzüchters steht, ein sehr komplexes Merkmal. Der Bedarf der Auslese leistungsfähiger und an diverse Bedingungen angepasster Sorten macht es notwendig, die genetischen Faktoren für bedeutsame Eigenschaften zu kennen. Durch das Wissen um diese genetischen Teilmerkmale und mit Hilfe molekularer Markertechnologien können gewünschte Eigenschaften wesentlich schneller und gezielter in Zuchtlinien eingekreuzt werden, so dass der Zuchterfolg neuer Sorten nicht allein auf Zufall beruht und planbarer wird. Auch stellt diese Methodik eine sinnvolle Herangehensweise beim Einkreuzen verwandter Wildarten in Nutzpflanzensorten dar (Tanksley and Nelson, 1996). Allerdings birgt gerade das Einbringen exotischer Allele in den vorhandenen Genpool auch Gefahren. Selbst beim Einkreuzen einer relativ kleinen Genregion kann es durch Elemente, die diese positive Region flankieren, zu negativen Effekten bei anderen Eigenschaften kommen (Rasmusson and Phillips, 1997). Durch das gezielte Einkreuzen exotischer Gene in das Elitematerial kann z. B. viel schneller auf neu auftretende Kulturschädlinge und Krankheiten reagiert werden, was aufgrund der prognostizierten sich ändernden Umweltbedingungen in Zukunft von großer Bedeutung sein sollte. Ein aktuelles Beispiel für die Kulturpflanze Mais ist der Maiszünsler (*Ostrinia nubilalis*, Z-

Rasse), der sich aufgrund der Klimaerwärmung verstärkt in Europa Richtung Norden ausbreitet und für den eine Resistenz gesucht wird (Papst et al., 2004). Auch im tropischen Mais-Material lassen sich QTLs für eine Resistenz gegenüber dem Maiszünsler finden und durch die Markertechnologie besitzen sie auch das Potenzial in den europäischen Genpool eingekreuzt zu werden (Samayoa et al., 2015), gleichzeitig soll der europäische Genpool seine für die gemäßigten Zone wichtigen Eigenschaften beibehalten.

Für *Zea mays* wurden, wie für die meisten Nutzpflanzen, zahlreiche QTLs für unterschiedliche Eigenschaften identifiziert. Dies gilt auch für verschiedene Wurzeleigenschaften (Burton et al., 2015; Hund et al., 2011). Es wurden auch QTLs für Wurzeleigenschaften gefunden, welche sich mit denen für Kornertrag überlappen (Pestsova et al., 2016; Tuberosa et al., 2002).

4.5.2 Voraussetzungen und Strategie einer QTL-Kartierung

Soll der Locus bzw. sollen die Loci einer quantitativen Eigenschaft kartiert werden, muss zunächst eine Möglichkeit der Bonitierung bzw. Messung für den zu untersuchenden Phänotyp gefunden werden. Wenn der zu untersuchende Phänotyp nicht erfassbar ist, kann alternativ auch ein anderer Phänotyp als Surrogatphänotyp zur Kartierung genutzt werden, falls er mit dieser Eigenschaft assoziiert ist. Für eine QTL-Analyse und -Kartierung ist es notwendig, dass das untersuchte Merkmal innerhalb des Genpools Variation zeigt. Eine weitere Voraussetzung, um einen QTL zu kartieren, ist eine genetische Landkarte auf der Grundlage molekularer Marker mit einer ausreichenden Genomabdeckung (Meksem et al., 2005).

Sind diese Voraussetzungen erfüllt, ist die nächste Voraussetzung, dass aufspaltende Kartierungspopulationen aus doppelhaploiden Linien oder rekombinanten Inzuchtlinien hergestellt werden können. Die Anzucht der DH-Kartierungspopulation kann bei *Zea mays* aus den Pollen oder durch sogenannte „Inducer“-Linien erfolgen (Prigge and Melchinger, 2012). Die Kartierungspopulation wird mit Hilfe der molekularen Marker genotypisiert und auf die Ausprägung des quantitativen Merkmals hin analysiert. Durch eine Korrelationsanalyse dieser Ergebnisse kann die Eigenschaft bestimmten

Chromosomenregionen (QTLs) zugeordnet werden. Aufgrund der Analyse der Aufspaltung kann auch das Ausmaß der Beeinflussung des einzelnen QTL an der untersuchten Eigenschaft abgeschätzt werden, wobei die einzelnen QTLs eine unterschiedlich starke Wirkung auf eine quantitative Eigenschaft haben können (Tanksley and Nelson, 1996).

Soll ein QTL-Bereich feiner kartiert werden bzw. auf einzelne Gene herunter gebrochen werden, ist die Verfügbarkeit von nahe-isogenen Linien (NILs) bzw. SubNILs, deren QTL-Stücke des Donor-Elters sich überschneiden, von Nutzen. Im Rahmen in dieser Arbeit durchgeführten Experimente einerseits, damit alle Gene und Bereiche in voller Länge erfasst werden können andererseits, um den zu untersuchenden Bereich in den weiteren Generationen weiter einengen zu können. NILs bzw. SubNILs können durch wiederholtes Rückkreuzen von doppelhaploiden Pflanzen der Kartierungspopulation mit der Elternlinie, welche das negative Allel enthält, erzeugt werden. Parallel zu den Rückkreuzungen muss der Prozess durch Genotypisierungen überprüft werden. In jeder Generation wird analysiert, wie groß der QTL-Bereich ist, bzw. ob die QTL-Region nicht durch Rekombination DNS-Stücke des rekurrenten Elters enthält. Durch den Einsatz der molekularen Marker und der NILs, bei denen der QTL durch Rückkreuzungen mit dem rekurrenten Elter immer kleiner wird, kann der QTL im günstigsten Fall auf ein einzelnes Gen oder zumindest eine kleinere Genregion mit wenigen Genen eingegrenzt werden. Da QTLs insbesondere bei Kulturpflanzen wie *Zea mays* sehr große Chromosomenabschnitte beinhalten können und nicht immer eine ausreichende Dichte genetischer Marker vorhanden ist, kann alternativ auch versucht werden, mögliche bekannte Kandidatengene und Mutationen innerhalb der QTL-Regionen zu ermitteln, die vermeintlich etwas mit dem relevanten Allel zu tun haben könnten (Meksem et al., 2005).

Ein weiterer Ansatz zur Verifizierung bietet die Analyse der DNS-Transkripte, bei der untersucht wird, ob die Kandidatengene der QTL-Region in den Elternlinien unterschiedlich stark exprimiert werden. Segregieren diese Expressionsunterschiede gemeinsam mit der untersuchten Eigenschaft, ist dies ein starker Hinweis darauf, dass die untersuchten Gene im direkten Zusammenhang mit dem untersuchten Allel stehen (Xiao et al., 2015).

4.6 Problematik bei der Phänotypisierung von Wurzelmerkmalen

Bei den meisten Pflanzen befinden sich die Wurzeln im Substrat oder Erdboden. Will man die Wurzeln auf diverse Eigenschaften hin untersuchen, stellt dies den Experimentator vor gewisse Herausforderungen. Eine simple, aber arbeitsaufwändige Methode ist das Entfernen des Substrates und damit verbunden die Entnahme der Pflanze vom Wachstumsort. Diese Methode ist destruktiv, und die verwendeten Pflanzen sind nach erfolgter Auswertung nicht mehr zu gebrauchen. Des Weiteren besteht bei vielen Substraten die Gefahr, dass insbesondere feine Teile des Wurzelsystems, wie z. B. Lateralwurzeln und Wurzelhaare, teilweise zusammen mit dem Substrat entfernt werden. Ganze Wurzelsysteme sind sehr komplex und leicht zu beschädigen, ebenso wie der Boden, in dem sie wachsen (Lynch and Brown, 2012). Dieses Problem kann umgangen werden, indem man spezielle Substrate zur Kultur der zu phänotypisierenden Pflanzen verwendet. Diese können beispielsweise leichter zu entfernen sein oder wie die Anzucht auf Agar ein direktes Erfassen der Wurzelmerkmale während der Kultur erlauben. Mit dem Substrat Turface® gibt es erste speziell für die Wurzelphänotypisierung im Gewächshaus entwickelte Substrate (Goron et al., 2015). Ein Nachteil vieler dieser Ersatzsubstrate ist, dass sie meist hoch artifiziell sind und wenig mit den Bodenbedingungen auf dem Feld zu tun haben. Zum Teil entwickeln sich Wurzeln sogar anders als in ihrer natürlichen Umgebung, weshalb es zum Beispiel mit einem gewissen Aufwand verbunden ist, in Flüssigkultur Wurzelhaare zu erzeugen. Bei dem meisten Kulturführungen in Hydrokulturen bilden Pflanzen keine Wurzelhaare aus (Guo-dong and Phung, 2006).

4.6.1 Messung der elektrischen Kapazität von Wurzeln – eine nicht-invasive *in-situ*-Lösung

Die Analyse der Oberfläche und Masse von Wurzelsystemen *in situ* während eines Feldversuches ist mühsam und unpräzise, da die Pflanzen aufwendig ausgegraben und gereinigt werden müssen, will man alle Wurzelsystembestandteile bergen. Die Methode des Ausgrabens ist zudem stets destruktiv und führt den Verlust der Pflanze mit sich, so dass ein Bedarf an nicht-invasiven Methoden besteht (Cao et al., 2010; Dietrich, 2013;

Ellis, 2013a, b). Nur für sehr spezielle Fragestellungen ist das Ausgraben von Wurzelsystemen eine Lösung, wenn zum Beispiel die Winkel von groben Kronwurzeln bestimmt werden sollen (Trachsel, 2011).

Schon früh wurde eine Beziehung zwischen der elektrischen Kapazität von Pflanzenwurzeln und weiteren Parametern gefunden (Chloupek, 1972). Jahre später stellte Dalton diese Methodik bei *Lycopersicon esculentum* vor und sah in ihr eine vielversprechende Methode, Wurzelmasse zu erfassen, die weiter entwickelt werden sollte (Dalton, 1995). Er erklärte die physikalischen Hintergründe damit, dass das Xylem als innerer Leiter vom äußeren Leiter, in dem Fall der Bodenlösung, durch das Wurzelgewebe getrennt ist. Dadurch, dass alle Einzelwurzeln über das Xylem miteinander verbunden sind, addieren sich die einzelnen Kapazitäten im gesamten Wurzelsystem. Dalton ging davon aus, dass insbesondere die Dicke des Wurzelgewebes und dessen Volumen und somit die Oberfläche die Kapazität von Wurzeln als Kondensatoren maßgeblich beeinflussen, aber auch die Art und Qualität und die damit verbundenen unterschiedlichen Zellinhalte.

Verschiedene Autoren bewerten die Ergebnisse der Messung der elektrischen Kapazität von Wurzeln sehr unterschiedlich. Chloupek fand nicht für alle analysierten Pflanzenarten eine Korrelation zwischen Kapazität und der Oberfläche der Wurzeln, wohl aber bei *Zea mays* (Chloupek, 1972). Andere Autoren fanden bei Maiswurzeln nur zu bestimmten Entwicklungszeitpunkten und Bedingungen eine Korrelation für die Wurzelfrischmasse mit deren elektrischer Kapazität (van Beem, 1998).

4.7 Entwicklung des analysierten Pflanzenmaterials, QTL-Berechnung und vorangegegangene Untersuchungen

Die in dieser Dissertation untersuchten Maislinien waren Teil eines Zuchtprogramms des Projektpartners KWS SAAT SE. Es handelte sich um die Inzuchtlinie SL, die sensitiv („sensitive“) für Kälte und effizient bei geringen („low“) Stickstoffbedingungen ist und TH, welche tolerant („tolerant“) gegenüber Kälte und effizient bei hohen („high“) Stickstoffbedingungen ist. Das ursprüngliche Ziel des Zuchtprogramms war die Entwicklung von Inzuchtlinien, die zu Körnermais-Hybriden führen, welche besser die

schwankenden und suboptimaleren Bedingungen des ökologischen Landbaus tolerieren (Presterl et al., 2003). Die unter niedriger Stickstoffzufuhr ausgelesenen Inzuchtlinien zeigten aber auch einen Mehrwert für das herkömmliche Hybrid-Zuchtprogramm und wirkten sich positiv auf die Ertragsstabilität der mit ihnen entwickelten Hybriden aus (mündliche Kommunikation mit KWS SAAT SE). Die quantitativen Hintergründe und Potentiale für Stickstoffnutzeffizienz im europäischen Maisgenpool sind nur sehr marginal untersucht (Presterl et al., 2003). Die untersuchten Linien unterscheiden sich besonders stark hinsichtlich ihrer Stickstoffnutzeffizienz: Die Linie TH zeigt bei hohen Stickstoffbedingungen gute Kornertragsdaten, diese brechen allerdings bei niedriger Stickstoffzufuhr ein. Zusätzlich wird der obere Teil der Kolbenspindeln nicht vollständig aufgefüllt. Die Linie SL weist unter niedriger Stickstoffzufuhr einen deutlich höheren und damit stabileren Ertrag auf. Unter hohen Stickstoffbedingungen zeigten die Ertragsdaten der Testkreuzungen mit SL und TH hingegen ähnliche Ergebnisse im direkten Vergleich (mündliche Kommunikation; Daten KWS SAAT SE, unveröffentlicht).

Beide Linien wurden miteinander gekreuzt und aus der F1 eine doppelhaploide Kartierungspopulation (DH-Population) erstellt. Von dieser Population mit 720 Individuen wurden Testkreuzungen gemacht und diese auf dem Feld auf ihren Kornertrag bei hohen und niedrigen Stickstoffbedingungen getestet. Die DH-Linien wurden mit 188 genetischen Markern genotypisiert. Für 691 DH-Testkreuzungen lagen Daten für den Kornertrag vor. Die Berechnung der QTLs erfolgte mit dem Programm PLABQTL. Anhand der Daten konnten mehrere QTLs für Kornertrag durch „composite intervall mapping“ berechnet werden. Als LOD-Schwellenwerte wurde 3.0 gesetzt. Eine Übersicht gibt hierzu die Abbildung 3. Bei der Berechnung wurde unterschieden, ob der Ertrags-QTL einen positiven Effekt bei hoher (rote Markierung) oder bei niedriger Stickstoffzufuhr (grüne Markierung) zeigte. Dreizehn Ertrags-QTLs zeigten nur bei hoher Stickstoffzufuhr einen positiven Effekt auf den Kornertrag. Fünf QTLs wiesen einen sich überschneidenden positiven Effekt auf den Ertrag sowohl bei niedriger als auch bei hoher Stickstoffzufuhr auf. Für drei Ertrags-QTLs konnten positive Auswirkungen auf den Kornertrag nur bei geringer Stickstoffzufuhr ermittelt werden, die daraus folgernd mit einer besseren Stickstoffnutzeffizienz bei niedrigen Stickstoffbedingungen zusammenhängen sollten. Ein QTL für höheren Ertrag nur bei geringer Nitratdüngung konnte auf dem Chromosom 4 der Linie SL lokalisiert werden, welcher 5 % der phänotypischen Varianz erklärt. Die stärkeren QTLs mit einer Wirkung

nur bei niedrigen Stickstoffbedingungen liegen auf den Chromosomen 8 und 10 der Linie SL. Diese QTLs erklären für den QTL 8 11 % und für den QTL 10 13 % der phänotypischen Varianz, weshalb man sich auf die weitere Analyse dieser beiden QTLs fokussierte (Daten KWS SAAT SE, unveröffentlicht; Presterl et al. 2008, unveröffentlicht).

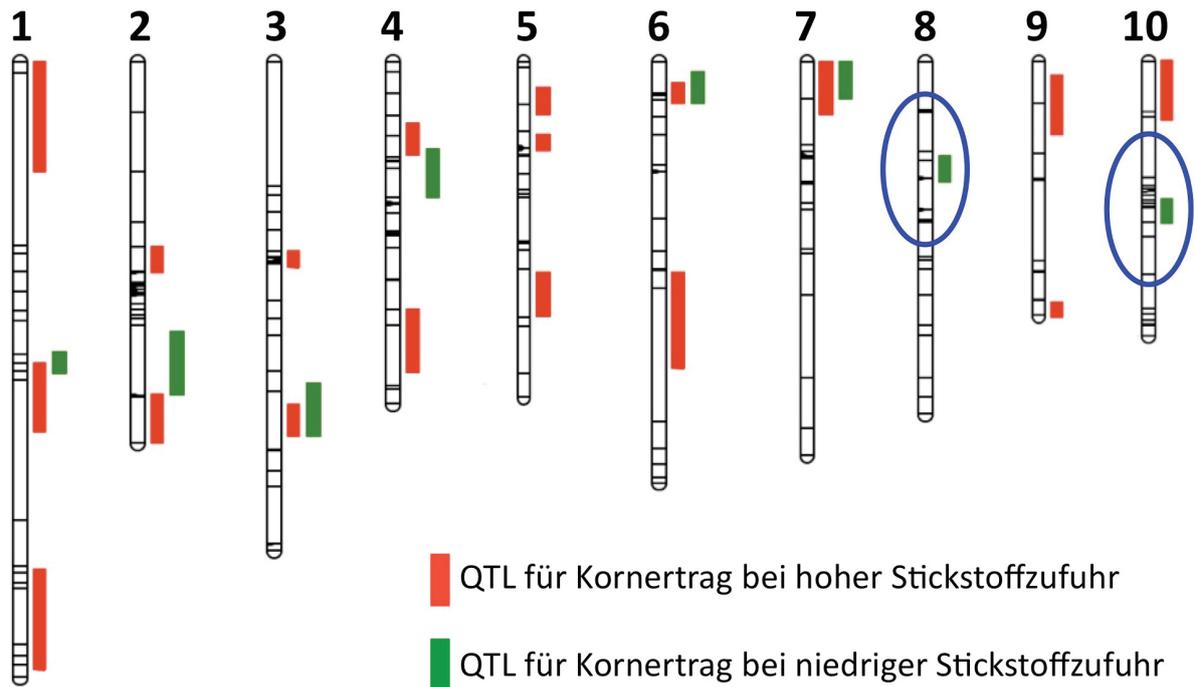


Abbildung 3. Übersicht über die Lage der kartierten QTLs für Kornertrag.

Die Abbildung gibt die Lage der mit Hilfe der Kartierungspopulation berechneten Lagen der QTLs wieder. Die rot markierten Bereiche geben die Lage von QTLs an, welche einen Mehrertrag bei hohen Stickstoffbedingungen bewirken, die grün markierten dagegen die Bereiche für QTLs, welche bei niedriger Stickstoffzufuhr auf den Kornertrag wirken. Bei vielen QTLs kommt es zu Überschneidungen. Mit den blauen Ellipsen wurden die beiden QTLs markiert, welche nur bei niedriger Stickstoffzufuhr wirken und im Rahmen dieser Dissertation analysiert wurden. Die Zahlen geben die Chromosomennummer der schematisch dargestellten Chromosomen an. Quelle: KWS SAAT SE, unveröffentlicht, geändert. Die gezeigten Daten basieren auf der ersten QTL-Berechnung (siehe 4.7.2).

Für die Feinkartierung der Ertrags-QTLs wurden NILs hergestellt, welche jeweils die QTL-Genregion des Elters SL in sich trugen und ansonsten den genetischen Hintergrund des anderen Elters TH besitzen. Eine Möglichkeit zur Herstellung von NILs ist das Rückkreuzen von geeigneten Individuen aus der DH-Population mit dem rekurrenten Elter TH. In mehreren Kreuzungsschritten wurden aus den ausgewählten DH-Linien die

NILs für QTL 8 und 10 entwickelt. Dabei war TH die rekurrente Linie für Chromosomensegmente des Donor-Elters SL, welche in den Feldversuchen eine Korrelation zwischen konstant hohem Kornertrag und niedrigem Stickstoffgehalt im Boden gezeigt hatte (Presterl et al., unveröffentlicht). Das Ziel waren NILs mit den fokussierten Ertrags-QTL-Bereichen aus der Linie SL. Durch erneute Rückkreuzungen mit dem Elter TH wurden die SL-stämmigen Chromosomensegmente dieser NILs weiter zerteilt und/oder verkleinert. Die so entwickelten Linien werden im Weiteren als SubNILs bezeichnet.

4.7.1 Vorangegangene Untersuchungen an den Maislinien SL und TH und deren Nachkommen

Die Elternlinien SL und TH wurden im Rahmen weiterer Arbeiten und Projekte untersucht. Die bessere Stickstoffnutzeffizienz der Linie SL unter limitierten Stickstoffbedingungen zeigt sich bei den Feldversuchen erst spät in der Entwicklung. Dann zeigt die Linie SL nämlich einen stabil höheren Ertrag und Wuchs gegenüber der Linie TH (Daten nicht gezeigt, Quelle: KWS SAAT SE).

Für die Linie SL konnte von Gou in Hydrokultur gezeigt werden, dass sie deutlich mehr Lateralwurzeln bei niedrigen Stickstoffbedingungen ausbildet als die Linie TH. Von der DH-Kartierungspopulation wurde eine Auswahl der hinsichtlich des Kornertrages bei niedrigen Stickstoffbedingungen besten und schlechtesten Linien getroffen und ebenfalls in Hydrokultur auf die Lateralwurzeldichte und -länge hin untersucht. Es konnte eine Korrelation zwischen der verstärkten Lateralwurzelsbildung und dem höheren Kornertrag beobachtet werden, die sowohl beim Elter SL als auch bei doppelhaploiden Linien der Kartierungspopulation auftrat (Abbildung 4, Gou et al., unveröffentlicht).

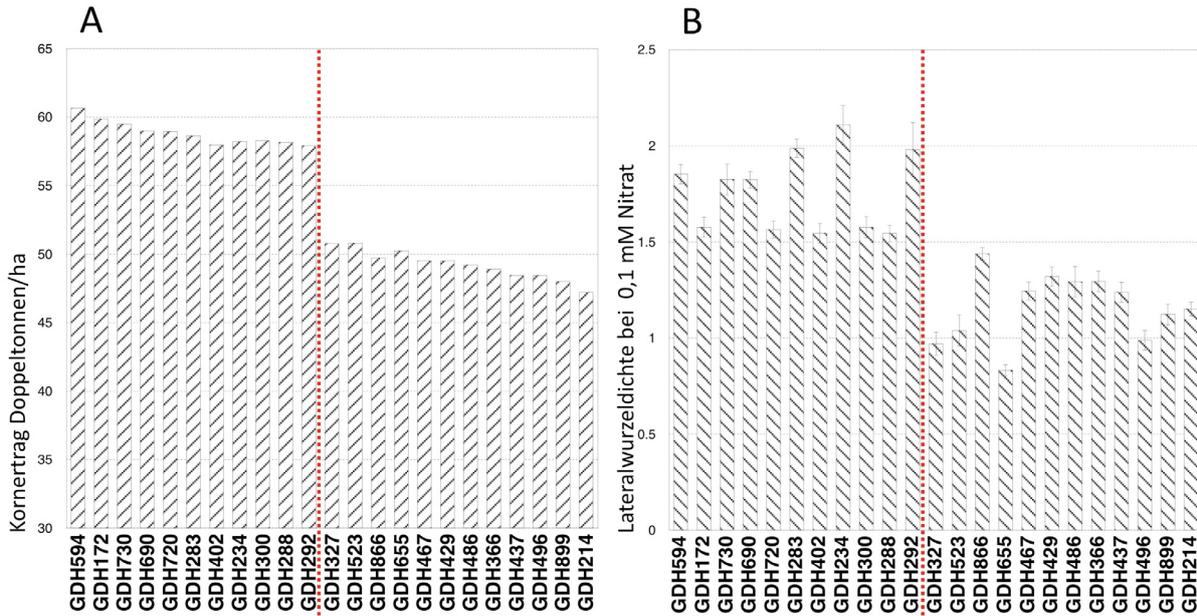


Abbildung 4. Korrelation zwischen Kornertrag und Lateralwurzelndichte von DH-Linien.

Die Abbildung zeigt eine Auswahl der von Gou (unveröffentlicht) auf Lateralwurzelndichte hin getesteten DH-Linien. A, Säulendiagramm, welches den Kornertrag in der Einheit Doppeltonnen/ha von 23 Testkreuzungen mit DH-Linien bei niedriger Stickstoffzufuhr zeigt. Links der rot gestrichelten Linie befinden sich DH-Linien mit einem höheren Ertrag. B, im Säulendiagramm wird für die im Diagramm A aufgeführten DH-Linien in gleicher Reihenfolge die Lateralwurzelndichte dargestellt. Linien mit niedrigem Kornertrag zeigten meist geringere Lateralwurzelndichten.

Für die beiden im Fokus stehenden QTLs wurden jeweils NILs entwickelt. Analysen von NILs für die QTLs 8 und 10 zeigten einen Einfluss des QTLs 8 auf die Lateralwurzelbildung in dem unter 5.5 beschriebenen Keimrollensystem. Anhand der aus den NILs entwickelten SubNILs wurde versucht, die QTL-Region 8 mit Hilfe des Lateralwurzelphänotyps zu begrenzen (unveröffentlichte Daten Claudia Tietze). Ob dieser Phänotyp für die Stickstoffnutzeffizienz und den erhöhten Ertrag verantwortlich ist oder sich zufällig nahe bei dem gesuchten Gen im QTL befindet und daher mit diesem zusammen segregiert, kann allerdings erst dann sicher gesagt werden, wenn das putative Gen isoliert und in eine ineffiziente Maispflanze transformiert worden ist. Zeigt diese Pflanze dann ebenfalls einen erhöhten Kornertrag und eine erhöhte Lateralwurzelndichte, nimmt das Gen im QTL 8 auf beide Phänotypen Einfluss.

Zur Absicherung des von Gou (unveröffentlicht) beobachteten Phänotyps, wurde in zahlreichen Experimenten mit den Elternlinien und einer NIL für QTL 8 (SL-N8-40x) sowie einer NIL für QTL 10 (SL-N10-1) diese Beobachtung überprüft. Im Rahmen der Diplomarbeit konnte statistisch bestätigt werden, dass es einen signifikanten

Zusammenhang zwischen der Lateralwurzelbildung der Primärwurzel und dem Genotyp der Pflanzen gibt, und dass eine höhere Lateralwurzelbildung der Elternlinie SL mindestens teilweise durch die Wirkung der Gene vom QTL 8 erklärt werden kann (Wever, 2010). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die erhöhte Lateralwurzelbildung unabhängig vom Nitratgehalt ist. Ein Zusammenhang zwischen erhöhter Lateralwurzelentwicklung, dem Nitratgehalt der Lösungen und den Genotypen der Linien konnte nur für den Phänotyp „Lateralwurzelbildung der längsten Seminalwurzel“ gefunden werden. Auch hier konnte eine signifikant erhöhte Anzahl von Lateralwurzeln für die Linie SL und die NIL 8 statistisch bestätigt werden (Wever, 2010). Neben dem höheren Ertrag bei niedrigen edaphischen Nitratkonzentrationen gegenüber der Elternlinie TH ist für den QTL 10 und damit für die hierfür entwickelten NILs 10 zu Beginn dieser Dissertation kein mit dem QTL korrelierender Phänotyp bekannt.

4.7.2 Änderung der QTL-Loci nach Neuberechnung mit deutlich größerer Markeranzahl zum Projektende

Die Berechnung der Kornertrags-QTLs im Jahr 2002 (siehe Kapitel 4.7) beruhte auf nur 188 über das Genom verteilte SSR-Marker. Zum Projektende und damit auch zum Ende dieser Dissertation wurde anhand der alten Ertragsdaten der Kartierungspopulation und der aktuellen Markerlage von 622 Markern die Position der QTL-Loci erneut berechnet. Dadurch kam es zu einer veränderten Lage der berechneten QTL-Bereiche auf den Chromosomen 8 und 10. Diese Veränderung ist in der Abbildung 5 schematisch dargestellt.

Im Rahmen der gezeigten Experimente werden jeweils für die Genotypen die Loci beider QTL-Berechnungen dargestellt. Im Folgenden werden die QTL-Berechnung auf Grundlage der 188 SSR-Marker als „alter QTL“ bezeichnet, die Loci der erneut berechneten QTLs als „neue QTLs“. Durch die Verschiebung der QTL-Lage trugen viele der entwickelten Linien in der Retroperspektive, keine oder nur eine unvollständige Introgressionen der QTL-Region. Im Fall des QTL 8 überschneiden sich neuer und alter QTL nicht. Beim QTL 10 gab es dagegen eine Überlappung des alten QTL-Bereichs als auch des neuen Bereiches.



Abbildung 5 Schematische Darstellung von alten und neu berechneten Ertrag-QTLs auf den Chromosomen 8 und 10.

A zeigt schematisch die Lage des alten und des neu berechneten Ertrags-QTL für das Chromosom 8. Nach der Neuberechnung des Ertrag-QTL mit deutlich mehr Markern kam es zu einer deutlichen Verschiebung seiner Lage und die Größe des Bereichs verkleinerte sich. B zeigt die Änderungen für das Chromosom 10. Der dort kartierte QTL-Bereich wurde aufgrund der höheren Markerdichte ebenfalls dichter. Die Lage auf dem Chromosom 10 blieb aber innerhalb des ursprünglichen Vertrauensintervalls.

4.8 Ziele der Dissertation

Ein wichtiges Zuchtziel bei Mais ist eine Erhöhung der Stickstoffnutzeffizienz. Von den beiden züchterisch genutzten Maislinien SL und TH, zeichnet sich die Linie SL durch einen stabil höheren Ertrag bei Stickstoffmangelbedingungen gegenüber der Linie TH aus. Für dieses quantitative Merkmal wurden zwei, bei niedrigen edaphischen Stickstoffkonzentrationen wirksame QTLs, auf den Chromosomen 8 und 10 identifiziert. Im Rahmen dieser Dissertation sollte analysiert werden wodurch die Unterschiede der Stickstoffnutzeffizienz der Linien TH und SL begründet sind. Dieses Ziel soll durch folgende genetische, physiologische und molekularbiologische Untersuchungen erreicht werden.

1. Genetische Analyse der Wurzelarchitektur der Elternlinien

Die Wurzelarchitektur von Pflanzen kann entscheidend deren Nährstoffeffizienz beeinflussen. Für den nach der QTL-Berechnung stärksten QTL auf Chromosom 10 war kein möglicher verantwortlicher Phänotyp bekannt. Das Ziel war es, einen Phänotyp zu finden, der mit diesem Chromosomenbereich korreliert und weiterführend diesen Phänotyp innerhalb der QTL-Region näher zu lokalisieren. Bezüglich des QTLs auf Chromosom 8 wurde bereits in vorhergegangenen Arbeiten gezeigt, dass es eine Korrelation zwischen dem Mehrertrag von DH-Linien und deren Lateralwurzelichte geben könnte. Ein Teilziel dieser Dissertation war es, den Phänotyp weiter zu charakterisieren und dessen genetischen Locus näher zu bestimmen und, falls möglich, auf ein bestimmtes Gen herunter zu brechen.

2. Physiologische und molekularbiologische Untersuchungen der Stickstoffnutzeffizienz

Pflanzen reagieren in vielfältiger Weise auf Nitrat. Das Ziel war eine Analyse der Reaktion der Elternlinien SL und TH auf unterschiedliche Nitratzufuhr. Ein weiteres Ziel dieser Dissertation war die Evaluation der Konzentration des im Pflanzenmaterial vorhandenen Stickstoffes. Darüber hinaus sollte untersucht werden, ob sich weitere Unterschiede finden lassen die Hinweise auf die Ursachen der unterschiedlichen Stickstoffnutzeffizienz der Maislinien TH und SL geben.

Die Messung der elektrischen Kapazität scheint eine der wenigen nicht-invasiven und auf dem Feld praktikablen Methoden für die Phänotypisierung von Wurzeln zu sein. Das Ziel war es zu klären, ob sich diese Methodik in den während der Dissertation laufenden Feldversuchen zuverlässig für die untersuchten Linien anwenden lässt.

Genomweite Studien der Gentranskription können wichtige Hinweise auf unterschiedliche genetische Reaktionen zwischen zwei Individuen liefern. Ein Zielpunkt dieser Dissertation war es, die Unterschiede der Transkription des Wurzelgewebes zwischen beiden Mais-Elternlinien zu analysieren. Es sollte die transkriptionelle Reaktion des Wurzelgewebes auf unterschiedliche äußere Nitratkonzentrationen und im zeitlichen Verlauf vergleichend untersucht werden. Dies sollte klären, ob sich Hinweise auf Gene oder Genregulatoren finden lassen, die für die Unterschiede im Kornertrag verantwortlich sind.

5 Material und Methoden

5.1 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien hatten p.a.-Qualität und wurden von den folgenden Firmen bezogen: Duchefa (Haarlem, Niederlande), Fluka (Buchs, Schweiz), Merck (Darmstadt, Deutschland), Riedel-de Haën (Seelze, Deutschland), Roth (Karlsruhe, Deutschland), Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland). Enzyme und weitere Materialien sind an den entsprechenden Stellen gesondert mit ihren Bezugsquellen angegeben.

5.1.1 Enzyme

Phusion-High-Fidelity-DNS-Polymerase (ThermoFisher Scientific, Waltham, USA)

Taq-Polymerase selbst aufgereinigte DNS-Polymerase des Instituts

SuperScript II Reverse Transcriptase (ThermoFisher Scientific, Waltham, USA)

5.1.2 Reagenziensätze

KAPA Library Quantification Kit (Kapa Biosystems, Wilmington, USA)

TruSeq® RNA Sample Prep Kit-v2, 48 Set A (Illumina, San Diego, USA)

TruSeq® SBS Kit v3-HS (50 CYCLES) (Illumina, San Diego, USA)

TruSeq® SR Cluster Kit v3 cBot™ -HS (Illumina, San Diego, USA)

5.1.3 Oligonukleotide

Alle verwendeten Oligonukleotide für die Analyse mit genetischen Markern wurden von der Firma ThermoFisher Scientific, (Waltham, USA) synthetisiert.

Marker 164-44P51/50 (gestellt von Karin Ernst), kartiert auf Chromosom 4:

Oligonukleotid 1: 5'-GGCACTTGTGATCACACAG-3'

Oligonukleotid 2: 5'-ATCTCTAGATACATCCTACAC-3'

Marker umc1336, kartiert auf Chromosom 10 (<http://www.maizegdb.org>, (Andorf et al., 2016)):

Oligonukleotid 1: 5'-CTCTGTTTTGGAAGAAGCTTTTGG-3'

Oligonukleotid 2: CTGCCCTTGCTTATCATTTGTAC-3'

5.1.4 Weitere Reagenzien

Aatiram 65-Beize	(Stähler, Stade, Deutschland)
Agencourt AMPure XP Beads	(Beckmann Coulter, Brea, USA)
Biozym® LE-Agarose	(Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland)
dATP, dCTP, dGTP, dTTP	(ThermoFisher Scientific, Waltham, USA)
1 kb-DNS-Leiter	(ThermoFisher Scientific, Waltham, USA)

5.2 Pflanzenmaterial

5.2.1 Saatgutproduktion und -qualität

Es wurde Saatgut der Inzuchtlinien SL und TH sowie der aus denen entwickelten NILs bzw. SubNILs verwendet (KWS SAAT SE, Einbeck, Deutschland). Diese Linien waren durch die Selbstungen homozygot. Soweit dies möglich war, wurden die Samen der Linien innerhalb eines Versuches am selben Standort und im selben Jahr produziert.

Für die Feldversuche wurde, je nach Art des Versuches, entweder Saatgut der Linien bzw. deren NILs und SubNILs oder Saatgut von sogenannten Topcross-Bestäubungen verwendet. Bei einem Topcross wird in der Maiszüchtung eine entwickelte Inzuchtlinie mit einer anderen Varietät, dem sogenannten Tester, gezielt gekreuzt. Die erhaltenen Pflanzen waren Hybriden. In den aufgeführten Experimenten diente der Topcross auch dazu, mögliche vorhandene Inzuchtdefekte zu reduzieren, um so die homozygoten Inzuchtlinien besser untereinander vergleichen zu können (Sprague, 1946). Im Fall dieser Versuche geschah dies mit dem Tester 1 der KWS SAAT SE. Im Folgenden werden diese so erzeugten Hybriden als Testkreuzungen bezeichnet.

5.2.2 Übersicht über die verwendeten Saatgutchargen in den Laborversuchen

Neben den Elternlinien SL und TH wurde für die Experimente auch Saatgut verschiedener NILs verwendet, welche Introgressionen der Linie SL besaßen und ansonsten genetisch identisch mit dem Elter TH waren. Diese Linien besaßen entweder Introgressionen auf dem Chromosom 8 oder 10 jeweils im Bereich der Ertrags-QTLs. Die Bezeichnung N8 oder N10 zeigt an auf welchen der beiden Chromosomen die Introgression lag. Aus den Linien SL-N10-1 und SL-N10-2 wurden SubNILs entwickelt deren Introgressionen durch Rückkreuzungen reduziert waren. Die SubNILs A und B wurden aus der Linie SL-N10-1, die SubNILs C und D aus der Linie SL-N10-2 entwickelt. Die VP-Nummer sind interne Beszeichnungen der KWS Saat SE. Eine Übersicht gibt die Tabelle 1.

Tabelle 1 Übersicht über die verwendeten Saatgutchargen

Die Tabelle gibt eine Übersicht der in dieser Dissertation verwendeten Saatgutchargen und VP-Nummern.

Linie	VP-Nummer	Experiment
SL	VP2-30779	Grobkartierung Wurzelwinkel E1/E2 (siehe 6.2.4)
TH	VP2-30704	Grobkartierung Wurzelwinkel E1/E2 (siehe 6.2.4)
SL-N10-1	VP2-30710	Grobkartierung Wurzelwinkel E1/E2 (siehe 6.2.4)
SL-N10-2	VP2-30711	Grobkartierung Wurzelwinkel E1/E2 (siehe 6.2.4)
SL-N8-30X	VP2-31529	Grobkartierung Wurzelwinkel E1/E2 (siehe 6.2.4)
SL-N8-32X	VP2-31532	Grobkartierung Wurzelwinkel E1/E2 (siehe 6.2.4)
SL	VP3-31801	Grobkartierung Wurzelwinkel E3/E4 (siehe 6.2.4)
TH	VP3-31802	Grobkartierung Wurzelwinkel E3/E4 (siehe 6.2.4)
SL-N10-1	VE2-62617	Grobkartierung Wurzelwinkel E3/E4 (siehe 6.2.4)
SL-N10-2	VE2-62616	Grobkartierung Wurzelwinkel E3/E4 (siehe 6.2.4)
SL-N8-30X	VE2-62633	Grobkartierung Wurzelwinkel E3/E4 (siehe 6.2.4)
SL-N8-32X	VE2-62636	Grobkartierung Wurzelwinkel E3/E4 (siehe 6.2.4)
TH	VE2-62507	Feinkartierung Wurzelwinkel E1-E4 (siehe 6.2.5)
SL	VE2-62508	Feinkartierung Wurzelwinkel E1-E4 (siehe 6.2.5)
SL-N10-1	VE2-62502	Feinkartierung Wurzelwinkel E1-E4 (siehe 6.2.5)
SL-N10-2	VE2-62503	Feinkartierung Wurzelwinkel E1-E4 (siehe 6.2.5)
SubNIL-D	VE2-62525	Feinkartierung Wurzelwinkel E1-E4 (siehe 6.2.5)
SubNIL-C	VE2-62522	Feinkartierung Wurzelwinkel E1-E4 (siehe 6.2.5)
SL-N8-26X	VE2-62554	Feinkartierung Wurzelwinkel E1-E4 (siehe 6.2.5)
SubNIL-A	VE2-62515	Feinkartierung Wurzelwinkel E3/E4 (siehe 6.2.5)
SubNIL-B	VE2-62516	Feinkartierung Wurzelwinkel E3/E4 (siehe 6.2.5)

5.2.3 Beizen des Saatguts

Für die Kultur in Hydrokultur oder in Keimrollen wurden alle Samen zwei bis fünf Tage vor dem Auslegen mit Aatiram 65 gebeizt (Stähler, Stade, Deutschland). Hierzu wurden 25 Samen mit 500 µl Beizmittel in einem Zentrifugenröhrchen (50 ml Fassungsvermögen) versetzt, geschüttelt und in Petrischalen über Nacht getrocknet.

5.3 Phänotypisierung der Pflanzen

5.3.1 Allgemeine Phänotypisierungsmethoden

Die Aufnahme von Pflanzengröße und Wurzellänge für Pflanzen aus kontrollierter Aufzucht im Gewächshaus oder der Klimakammer erfolgte, soweit nicht anders angegeben, mit einem handelsüblichen Lineal. Bei nicht-adulten Maispflanzen wurden zur Größenbestimmung die Blätter hochgestrichen und auf diese Weise die Gesamtlänge erfasst. Die photographische Dokumentation der Pflanzen erfolgte mit einer Lumix DMC-TZ5 (Panasonic, Osaka, Japan). Die Bestimmung der Biomasse wurde auf jeweils für den Gewichtsbereich geeigneten elektronischen Waagen durchgeführt. Die Trocknung von Pflanzenmaterial für die Bestimmung der Trockenmasse oder des Stickstoffgehaltes erfolgte für sieben Tage im Trockenschrank bei 60 °C. Das warme Material wurde in einen Exsikkator, bestückt mit Trockenperlen, gegeben und kühlte dort aus.

5.3.2 Entfernung von Nährlösung im apoplasmatischen Transportbereich

Die Aufnahme von Nährstoffen erfolgt in der Pflanzenwurzel zunächst apoplasmatisch. Dies bedeutet, dass der Transport passiv entlang der Zellwände geschieht. Zurückbleibende Nährlösung innerhalb dieses Transportbereiches kann also insbesondere bei hohen Konzentrationen die Messergebnisse für Nitratbestimmungen verfälschen. Um die Nährlösung aus dem apoplasmatischen Transportweg zu entfernen, wurden Wurzeln, die für eine spätere Stickstoffanalyse bestimmt waren, 15 Min in 0,5 M CaSO₄-Lösung bei 4° C inkubiert.

5.3.3 Vermessung der Wurzeln und Wurzelsysteme mit dem Programm WinRhizo™

Zur Bestimmung verschiedener Wurzelparameter wurde das Programm WinRhizo™ Pro V. 2009c (Regent Instruments Inc, Kanada) benutzt. Es wurden nur vollständig erhaltene Wurzelsysteme oder intakte Einzelwurzeln verwendet. Hierzu wurden abhängig von der Versuchsfragestellung einzelne Wurzelteile oder ganze Wurzelsysteme von der Nährlösung oder dem Substrat befreit und in Wasser aufbewahrt. Die Wurzeln wurden in für den Scanner (Epson Expression 10000XL 1.0, Epson, Suwa, Japan) einsetzbare Wasserschalen überführt und schwimmend gescannt. Wurden nur 10 cm Abschnitte der Primärwurzel analysiert, wurden die unteren 10 cm ab der ersten sichtbaren Lateralwurzel zurechtgeschnitten und eingescannt. Die so erhaltenen Wurzelbilder wurden mit dem oben genannten Programm analysiert und eventuell vorhandene Erdreste manuell mit der Radiergummifunktion des Programms entfernt. Es wurden folgende Kategorien für die Analyse gewählt:

Hauptwurzeln: 0,75–2,5 mm

Lateralwurzeln: 0–0,75 mm

Die erhaltenen Daten wurden als Microsoft Excel-Tabelle exportiert und in diesem Programm weiterbearbeitet.

5.3.4 Messung der elektrischen Kapazität von Maiswurzeln

Im Rahmen der Feldversuche und der Versuche im Gewächshaus wurde versucht, Rückschlüsse von der elektrischen Kapazität der Maiswurzeln auf die Gesamtwurzelmasse, sowie die Gesamtoberfläche zu ziehen. Alle Messungen wurden mit dem Kapazitätsmeter 810C (B&K Precision, Yorba Linda, USA) durchgeführt (van Beem, 1998). Vor allen Messungen wurde das Gerät im Bereich von 20 nF adjustiert. Nur Feldmessungen wurde der Skalierungsbereich von 200 nF gewählt. Bei den Gefäßversuchen wurden die Pflanzen eine Stunde vor der Messung durchdringend gewässert und die Beleuchtung während der Messung ausgeschaltet, um die

Verdunstung zu minimieren. Im Versuchsfeld wurde die Anode 6 cm über Erdoberfläche mit einer Klemme an den Spross befestigt, ohne diesen zu beschädigen (van Beem, 1998). Als Kathode diente ein 40 cm langer, Kupferstab mit einer Kantenlänge von 1 cm, der leicht angespitzt war. Bei Versuchen in den beschriebenen Gefäßen mit Sand als Substrat wurde die Kathode in eine Topfecke gestochen (siehe 5.5.3) und die Anoden in 3 cm Höhe am Spross befestigt. Um später die weiteren Daten einer Pflanze zuordnen zu können, wurden sie oberhalb der Anode mit einem beschrifteten Isolierband markiert. Bei Feldversuchen wurde die Kathode 30 cm von der zu messenden Pflanze entfernt 25 cm tief in den Boden gestochen. Der Versuchsaufbau im Feld wird in der Abbildung 6 gezeigt. Die Messwerte wurden notiert, nachdem sich der angezeigte Wert nach einer Minute stabilisiert hatte.

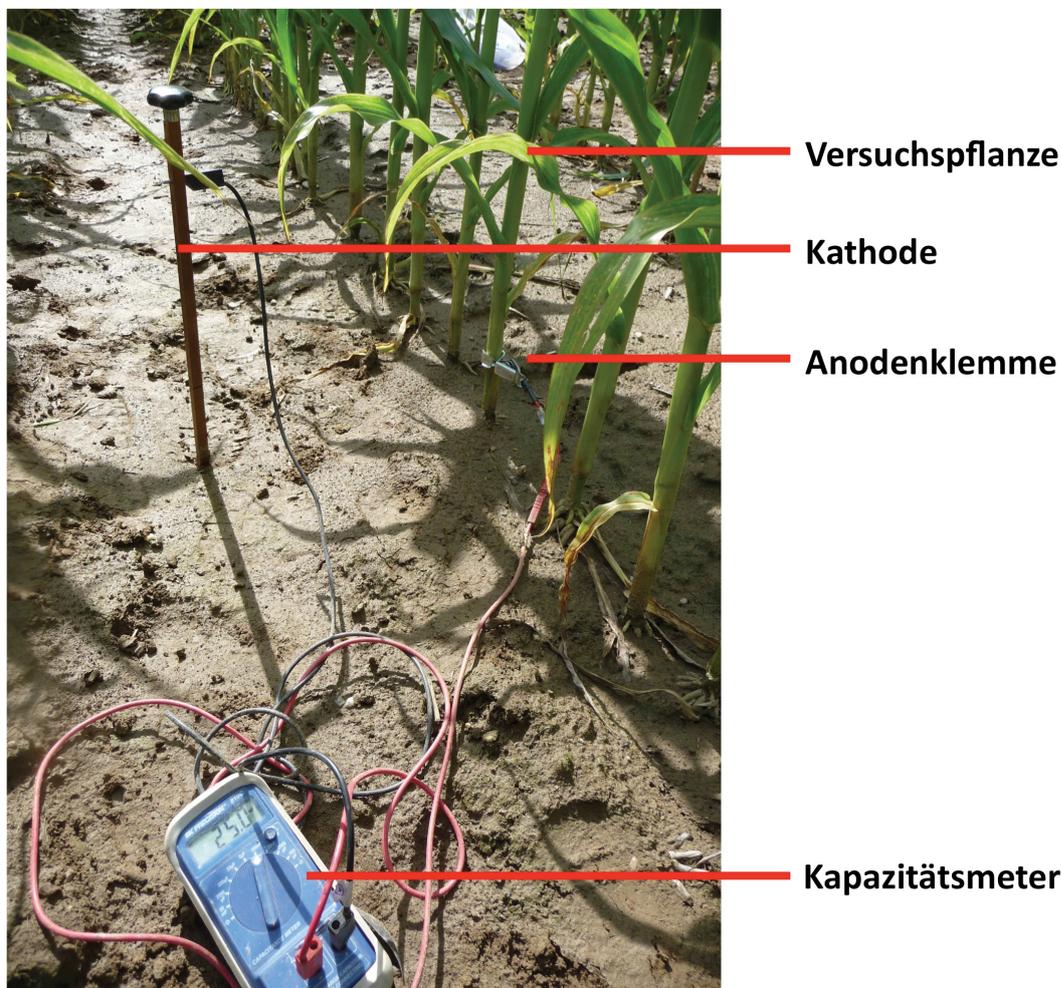


Abbildung 6. Messung der elektrischen Kapazität von Wurzeln im Versuchsfeld.

Die Abbildung zeigt die Messung der elektrischen Kapazität auf dem Versuchsfeld im bayrischen Grucking. Das Kapazitätsmeter war über ein Kabel mit der Anode aus Kupfer verbunden. Die Anode wurde 30 cm von der Versuchspflanze in die Erde gestochen. Mit dem zweiten Kabel wurde das Kapazitätsmeter mit der 6 cm über dem Erdoberfläche angebrachten Klemme verbunden.

5.3.5 Messung der Austrittswinkel von Kronwurzeln

Die drei Wochen alten Pflanzen wurden wie unter 5.5.3 beschrieben angezogen und vom Substrat befreit. Für die Messung der Austrittswinkel der Kronwurzeln wurde ein Geodreieck verwendet. Dazu wurde der Winkel zwischen der Sprossachse und den ersten 4 cm der austretenden Kronwurzel gemessen. Die Abbildung 7 zeigt schematisch die Messung eines Winkels an der Pflanze. Pro Pflanze konnten abhängig von der Anzahl vorhandener Kronwurzeln mehrere Winkel gemessen werden. Wurzeln, die beim Entfernen des Substrates beschädigt wurden, wurden nicht ausgewertet.

Bei *Zea mays* entstehen die ersten Kronwurzeln am Coleoptilenknoten (Abbildung 7 I). Dieser liegt knapp unter dem Substratoberflächenniveau, dadurch sind Messwerte im Bereich von etwa 85–90° bei annähernd horizontal austretenden und 180° bei senkrecht in die Erde wachsenden Kronwurzeln möglich. Die untersuchten Pflanzen hatten meist vier gleich gut entwickelte Kronwurzeln ausgebildet.

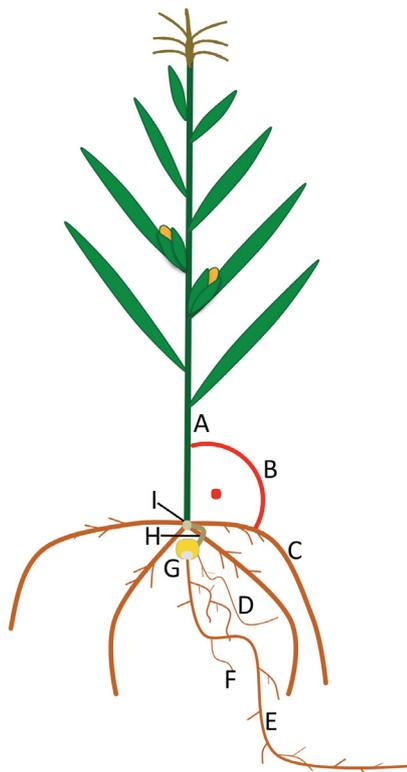


Abbildung 7. Schema zur Messung der Austrittswinkel von Kronwurzeln.

Das Schema zeigt die Messung der Austrittswinkel von Kronwurzeln. A, der Spross der Maispflanze; B, Austrittswinkel; C, eine der vier dargestellten Kronwurzeln; D, Seminalwurzel; E, Primärwurzel, F, eine der zahlreichen abgebildeten Lateralwurzeln; G, Maiskorn; H, Coleoptile; I, Coleoptilenknoten. Der dargestellte rot markierte Austrittswinkel beträgt ca. 90°.

5.3.6 Bestimmung des Stickstoff- bzw. Kohlenstoffgehaltes und Berechnung der Stickstoffnutzeffizienz

Für die Bestimmung des Stickstoffgehaltes wurde das Pflanzenmaterial wie in Kapitel 5.3.1 beschrieben getrocknet. Das trockene Material wurde zunächst grob zerkleinert und anschließend in die Kugelmühle MM 200 (Retsch, Haan, Deutschland). gegeben und für 8 Min. bei höchster Stufe fein gemahlen. Mit den pulverisierten Proben wurde vom Institut für Nutzpflanzenwissenschaften und Ressourcenschutz (INRES, Bonn, Deutschland) eine Elementaranalyse durchgeführt. Mit dem Elementaranalysator Fisons NA 2000 (gemäß ISO 10694, Fisons Instruments, Ipswich, England) wurde der Kohlenstoff/Stickstoff-Gehalt (C/N) der Proben bestimmt. Es wurden jeweils Doppelproben durchgeführt und deren Mittelwerte verwendet.

Die Berechnung der Stickstoffnutzeffizienz-Index erfolgte mit folgender Formel:

Stickstoffnutzeffizienz-Index = Trockengewicht Gewebe X (Trockengewicht Gewebe / Nitratgehalt des Gewebes) (Good et al., 2004)

5.3.7 Hypothesentest und Festlegung der Signifikanzniveaus

Um zu Testen welche Linie(n) sich signifikant unterscheiden wurde ein Zweistichproben-t-Test durchgeführt. Die Linie TH, welche das rekurrente Elternteil darstellt, wurde soweit nicht anders angegeben als Bezugsgröße gewählt, weil sie den genetischen Hintergrund für die untersuchten NILs und SubNILs bildet.

Die Bewertung der Aussagen, ob und mit welchem Maß die Unterschiede statistisch signifikant sind, beruht auf den folgenden zuvor festgelegten Signifikanzniveaus (α), ausgehend davon, dass eine Normalverteilung vorliegt:

α	\leq	0,1% ($\leq 0,001$)	=	hochsignifikant	***
α	\leq	1% ($\leq 0,01$)	=	sehr signifikant	**
α	\leq	5% ($\leq 0,05$)	=	signifikant	*

Anhand dieser Signifikanzniveaus können die erhaltenen p-Werte, welche die Irrtumswahrscheinlichkeit wiedergeben, auf ihre Signifikanz hin bewertet werden. Ein p-Wert von 0,01 bedeutet also, dass sich mit 99% Wahrscheinlichkeit eine Linie signifikant von anderen Linien unterscheidet und dieser Unterschied nicht auf Zufall beruht. Für die restlichen 1 % gilt hingegen die Annahme der Nullhypothese.

5.4 Feldversuche bei unterschiedlicher Nitratzufuhr

Die Daten der Feldversuche wurden in Zusammenarbeit mit der KWS SAAT SE erhoben. Ziel der Feldversuche waren Leistungsprüfungen der KWS SAAT SE hinsichtlich des Kornertrages. Gleichzeitig wurden Daten zur Entwicklung der Maislinien erhoben, Bonituren und Messungen der elektrischen Kapazität (5.3.4) im Rahmen dieser Dissertation durchgeführt. Es gab 3 Versuchsstandorte: Bernburg (Sachsen-Anhalt), Einbeck (Niedersachsen) und Grucking (Bayern). An allen Standorten gab es je zwei direkt beieinander gelegene Versuchsfelder, die eine unterschiedliche Düngung erfahren hatten. Jeweils eines der Felder wurde konventionell mit einer zugeführten Stickstoffmenge von 200 kg N ha⁻¹ gedüngt. Das andere Feld erhielt eine stickstofffreie Volldüngung. Die untergepflügte Pflanzenbiomasse nach der Kornernte stellte die einzige Stickstoffquelle für dieses Feld dar. Diese Feldführung war bei den Standorten in Bernburg und Grucking schon vor Versuchsbeginn über mehrere Jahre praktiziert worden, bei dem Versuchsfeld in Einbeck dagegen erstmalig im Versuchsjahr. Die für die Feldversuche genutzten Versuchsfelder waren auch schon für die Testung der Elternlinien und für die Berechnung der Ertrags-QTL verwendet worden.

Der Versuchsaufbau mit den Mais-Inzuchtlinien und den aus diesen entwickelten NILs und SubNILs erfolgte stets nach dem gleichen Schema: Es wurden je 100 Korn des jeweiligen Genotyps in einer Parzelle bestehend aus 2 Reihen mit je 50 Pflanzen ausgebracht. Von jeder Parzelle gab es innerhalb eines Versuchsfeldes – soweit das Saatgut reichte – mehrere randomisiert verteilte Wiederholungen. Die Randomisierung war notwendig, um Standorteffekte zu evaluieren, die durch beispielsweise diskontinuierliche Bodenunterschiede zustande kommen können. Die gleiche Anzahl von Prüfgliedern wurde immer an jedem Versuchsstandort getestet.

Es wurden verschiedene phänotypische Merkmale erfasst:

1. Pflanzengröße:

Hierzu wurde mit einem Zollstock die Größe einer repräsentativen Pflanze einer Parzelle vom Boden bis zur Fahnnenspitze gemessen.

2. Bonituren:

Eine Bonitur bezeichnet die Bewertung von pflanzlichen Eigenschaften anhand des Vergleiches mit weiteren Individuen. Es wurden verschiedene Bonituren der Versuchspflanzen durchgeführt. Hierzu wurden zunächst mehrere Parzellen bei einer Versuchsbedingung und insbesondere die beiden Elternlinien begutachtet. Nach dieser „Justierung“ des Auges wurden die einzelnen Parzellen hinsichtlich verschiedener Eigenschaften bewertet. Die Bewertung erfolgte nach einer jeweils festgelegten Skala.

5.5 Kultivierung von Maiskeimlingen bzw. -pflanzen unter kontrollierten oder semikontrollierten Bedingungen

5.5.1 Anzucht der Pflanzen in Keimrollen

Für die Anzucht von Mais in Keimrollen wurden je zehn gebeizte Samen gleichmäßig auf eine befeuchtete Lage Keimpapier (Anchor Paper, Hoffman Manufacturing, Inc., OR, USA) platziert. Die Samen befanden sich 3 cm vom oberen Rand entfernt und wurden so ausgerichtet, dass der spätere entspringende Spross zum oberen Rand hin gerichtet war. Die Samen wurden mit einem zweiten feuchten Keimpapier bedeckt und beide Papiere ähnlich einer Zigarre aufgerollt. Jeweils sechs dieser Einzelrollen wurden mit einem weiteren Keimpapier zusammengefasst und in ein 1 l Becherglas gestellt, welches mit 300 ml *Aqua demin.* aufgefüllt wurde. Das Saatgut wurde für drei Tage bei 25 °C im Dunkeln angekeimt. Einen Eindruck von der Kultur der Pflanzen in den Keimrollen gibt die Abbildung 8 wieder.

Die so vorgezogenen Keimlinge wurden entweder in Hydrokultur genommen oder für weitere Phänotypisierungsexperimente in den Keimrollen belassen. Für die weitere Anzucht in den Keimrollen wurden die Bechergläser in eine Klimakammer (Conviron, Manitoba, Kanada) gestellt. Dort wurden sie bei 16 h Licht ($300 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$) und 8 h Dunkelheit kultiviert. Die Temperatur betrug $25 \text{ }^\circ\text{C}$ während der Lichtzufuhr und $20 \text{ }^\circ\text{C}$ bei Dunkelheit. Während der Kulturzeit wurde der Wasserstand im Becherglas konstant bei 300 ml gehalten. Bei Experimenten in Keimrollen mit Nitratzufuhr wurden die unter 5.5.2.1 beschriebenen Lösungen verwendet.

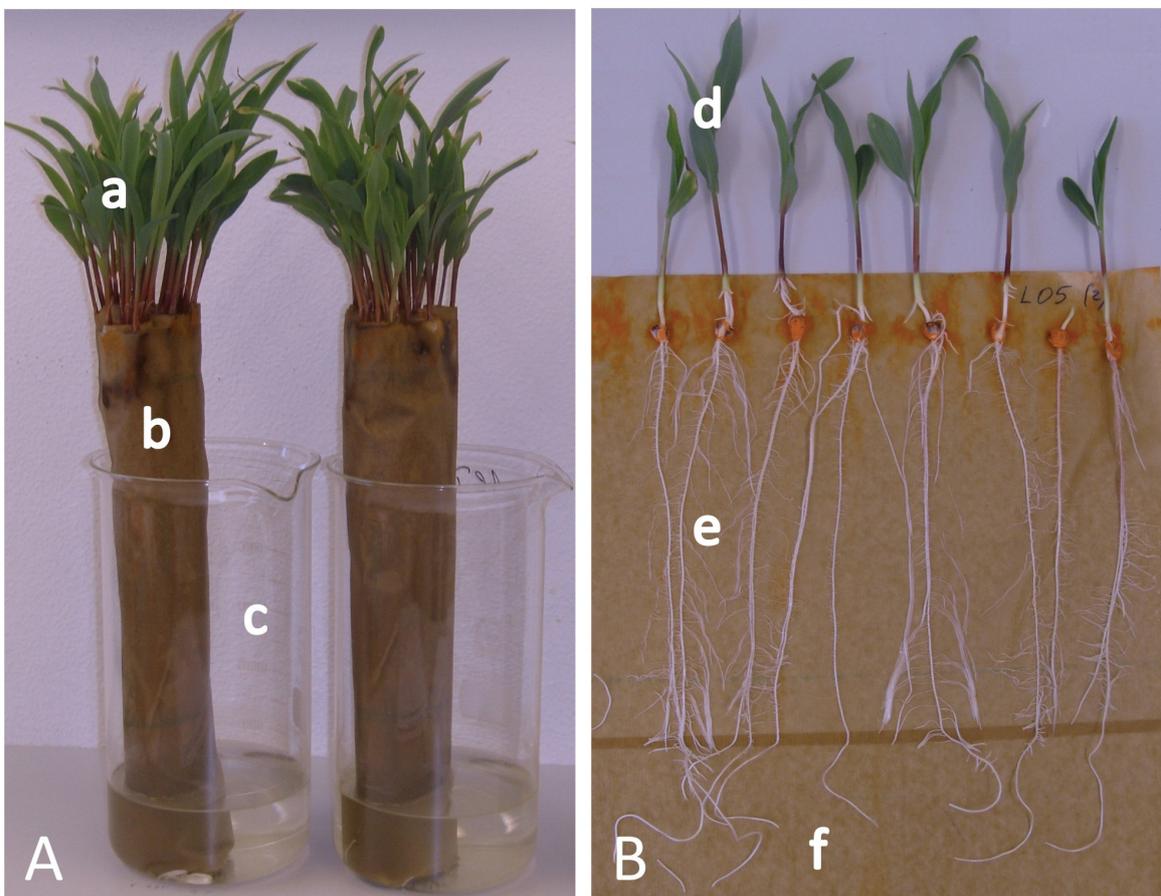


Abbildung 8 Maiskeimlinge in der Keimrollenkultur

Die Abbildung zeigt beispielhaft Maiskeimlinge, welche in Keimrollen angezogen wurden. Der Abbildungsteil A stellt die Maispflanzen während der Kultur dar. Es sind die zwölf Tage alten Keimlinge (a), die aufgewickelte Keimrollen (b) und das Becherglas (c) mit der Nährlösung sichtbar. Dagegen zeigt die Teilabbildung B eine entrollte Keimrolle. Dort sind neben den Keimlingen (d), auch die Wurzeln der Keimlinge (e) erkennbar. (f) ist das Keimpapier in dem sich die Sämlinge entwickelten.

5.5.2 Anzucht der Pflanzen in Hydrokultur

Bei der Anzucht in Hydrokultur wurden zunächst, wie bei der Kultivierung der Pflanzen in Keimrollen (5.5.1), Samen in längs halbierten Keimpapieren ausgelegt. Anschließend wurden je sechs einzelne Rollen mit einem weiteren Keimpapier zu einer größeren Keimrolle zusammengefasst. Diese kamen in einen mit etwa 100–150 ml *Aqua dest.* gefüllten 1 Liter Messbecher und wurden bei 25 °C für drei Tage dunkel im Brutschrank inkubiert. Die Kulturwannen „Cutting Boards“ (General Hydroponics, Sebastopol, California, USA) wurden mit *Aqua demin.* gewaschen und für 24 Stunden gewässert. Als Kulturtöpfe wurden PVC-Schlitztöpfe Typ S5,5 LB der Firma Pöppelmann (Lohne, Deutschland) gewählt. Je Wanne konnten 27 Stück dieser Kulturtöpfe in die Deckelplatte eingehängt werden.

Bei dem Kultursubstrat handelte es sich um handelsüblichen Blähton der Körnung 4–8 mm. Der Blähton wurde in *Aqua demin.* gewässert, bis das Waschwasser einen stabilen Leitwert unter 30 $\mu\text{S}/\text{cm}$ zeigte. Anschließend wurde der Blähton autoklaviert. Die Schlitztöpfe wurden jeweils zur Hälfte mit bereits gewässertem Blähton befüllt und in die Kulturwannen eingehängt (Abbildung 9). Die Höhe des Wasserstandes in der Kulturwanne wurde so hoch gewählt, dass der Blähton gerade bedeckt war. Die Keimrollen wurden entrollt und die Keimlinge ab einer Keimwurzellänge von mindestens 1 cm auf den Blähton gesetzt (Abbildung 9 A, B und C). Es wurde dabei darauf geachtet, dass die Primärwurzel Kontakt mit dem *Aqua demin.* hatte, die Samen aber nicht direkt mit dem Wasser in Berührung kamen. Nur unvollständig entwickelte Keimlinge wurden verworfen. Die keimenden Samen der einzelnen Linien wurden jeweils randomisiert in den Kulturwannen verteilt. Die Töpfe wurden mit gewässertem Blähton aufgefüllt, so dass die Keimlinge bedeckt waren (Abbildung 9 D). Es wurde hiernach die Belüftung der Wannen aktiviert (Wever, 2010). Die Belüftung der Kulturwannen erfolgte mit den Membranpumpen Marina 100 (Hagen, Holm, Deutschland), sowie mit Ausströmern der Bauart Long Long 250 mm (Dohse Aquaristik, Graftschaft, Deutschland).

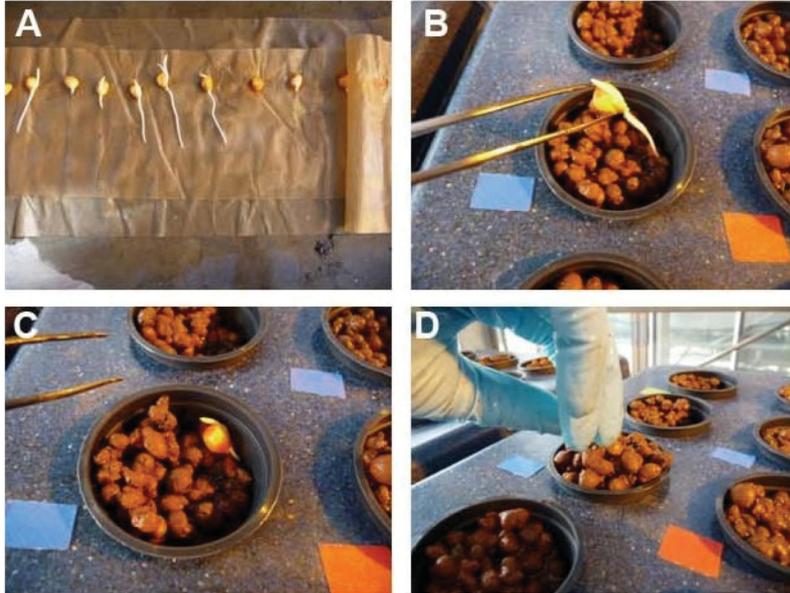


Abbildung 9. Überführung der Keimlinge in die hydroponische Kultur.

Die Bilderfolge zeigt das Einsetzen der *Zea mays*-Sämlinge in die Kulturtöpfe der Hydroponikwannen. A: Aufrollen der Keimrollen, B und C: Einsetzen eines Keimlings, D: Bedecken eines Keimlings mit Blähton. **Abbildung (Wever, 2010)**

Die Hydrokultur fand unter Gewächshausbedingungen statt. Neben der natürlichen Sonneneinstrahlung wurde zusätzlich beleuchtet, um eine genormte Mindestlichtintensität zu gewährleisten (12 h Licht/12 h dunkel). Hierbei wurden die Pflanzen mit Quecksilber- und Natriumhochdrucklampen (HDK 102-400 IK und SGR-K 200-400 IK, Philips, Hamburg, Deutschland) bei einer Lichtintensität von 200–300 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ beleuchtet. Je nachdem, wie stark die Sonne schien, betrug somit die Lichtintensität 200–1.000 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Die Beleuchtung wurde 24 Stunden nach dem Einsetzen der Keimlinge eingeschaltet. Die Temperatur wurde vom Tagesklima beeinflusst und zusätzlich künstlich auf eine Mindesttemperatur von 20 °C nachts und 25 °C tagsüber gehalten. Die Anzucht der Pflanzen für das Transkriptomexperiment erfolgte im Zeitraum vom 12.03.13 bis 16.04.13, aufgrund der geringen äußeren Sonneneinstrahlung waren sehr gleichmäßige Temperaturbedingungen vorhanden. Die Abbildung 10 zeigt beispielhaft Maispflanzen am achten Tag in der Hydrokultur.

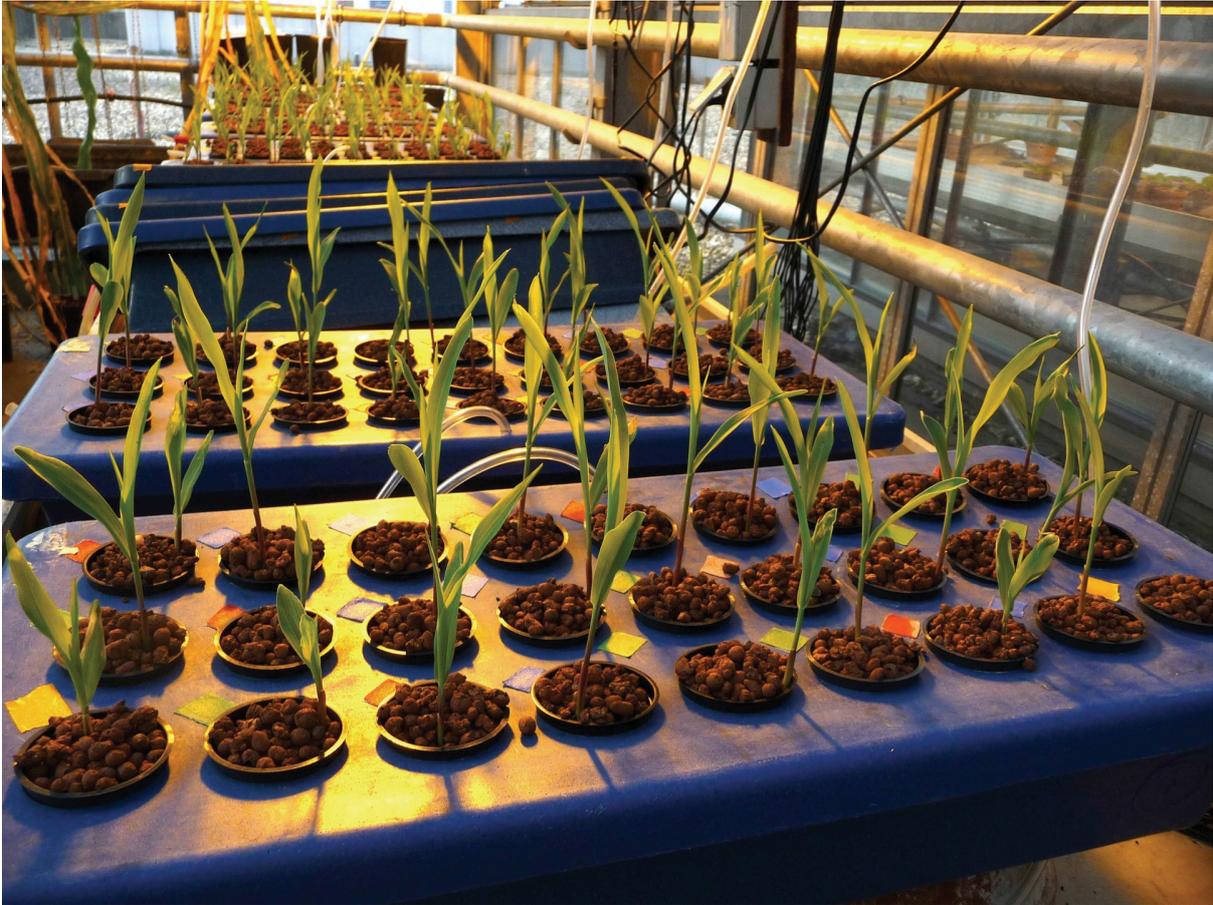


Abbildung 10. Acht Tage alte Maispflanzen in der Hydrokultur.

Die Abbildung zeigt junge Maispflanzen in der Hydrokultur. In den Kulturwannen ist maximal Platz für 27 Pflanzen. Man erkennt die Schlitztöpfe gefüllt mit Blähton die in der Hauptsache der Fixierung der Maispflanzen dienen. In jeder Kulturwanne befinden sich 13 l Nährlösung. Die Belüftung erfolgt mit Membranpumpen und Aquarienausströmern.

5.5.2.1 Nährlösungen für die Hydrokultur der analysierten Maispflanzen

Die in der Hydrokultur verwendeten Nährlösungen orientierten sich an den von Gorska beschriebenen Abwandlungen der von Hoagland propagierten Nährlösungen (Gorska et al., 2008) und den schon während der Diplomarbeit vorgenommenen Änderungen (Wever, 2010). Es wurden im Rahmen dieser Dissertation zwei verschiedene Kombinationen von Nährlösungen verwendet. Bei beiden Lösungen lag der eingestellte pH-Wert bei ≈ 6 und die Lösungen in den Hydrokulturcontainern wurden alle 3 Tage komplett gegen frisch angesetzte ersetzt. Der pH-Wert wurde mit H_2SO_4 eingestellt. In die Kulturwannen wurde jeweils 13 l der Nährlösung eingefüllt. Der Kulturablauf ist im Kapitel 5.5.2.2 schematisch dargestellt. Bei Experimenten, die der Phänotypisierung und

zu der Bestimmung des Nitratgehaltes dienen, wurden die Versuchspflanzen mit den in Tabelle 2 gezeigten Konzentrationen von Nährlösungen versorgt. Das Kulturschema wird in Abbildung 11 gezeigt.

Tabelle 2 Gesamtübersicht über die in der Hydrokultur verwendeten Konzentrationen von Makro- und Mikronährstoffen.

Makronährstoffe	Hoch	Medium	Niedrig
	1X	1X	1X
	<u>10 mM</u>	<u>1 mM</u>	<u>0,1 mM</u>
	[μM]	[μM]	[μM]
KNO₃	3975	397,5	39,75
Ca(NO₃)₂·4H₂O	3015	301,5	30,15
MgSO₄·7H₂O	270	270	270
KH₂PO₄	109	109	109
CaCl₂·2H₂O	25	300	573
K₂SO₄	-	200	377,5
Mikronährstoffe			
Fe-EDDHA	100	100	100
MnSO₄·H₂O	2	2	2
H₃BO₃	20	20	20
ZnSO₄·7H₂O	0,085	0,085	0,085
CuSO₄·5H₂O	0,15	0,15	0,15
Na₂MoO₄·2H₂O	0,25	0,25	0,25

Den Pflanzen für die Transkriptomanalyse von Wurzeln (5.6) und für die Gesamtstickstoffbestimmung (5.3.6) wurden nach den ersten drei Tagen nach der Überführung ein Vollmedium ohne Nitrate gegeben. Dieses Medium setzt sich wie in Tabelle 2 angeben zusammen ohne die Salze KNO_3 und $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$. Auch hier wurde der pH-Wert auf ≈ 6 eingestellt, wobei folgenden Nährsalzkonzentrationen: $270 \mu\text{M MgSO}_4$, $109 \mu\text{M KH}_2\text{PO}_4$, $100 \mu\text{M Fe-EDDHA}$, $20 \mu\text{M H}_3\text{BO}_3$, $2 \mu\text{M MnSO}_4$, $0.085 \mu\text{M ZnSO}_4$, $0.15 \mu\text{M CuSO}_4$ und $0.25 \mu\text{M Na}_2\text{MoO}_4$. Dieses Vollmedium wurde die vier Tage lang verabreicht, um Effekte durch andere Nährstoffe auszuschließen. Bei der Kontrolle ohne Nitratzufuhr wurde dieses Medium während der ganzen Versuchsdauer verwendet. Zusätzlich wurde eine Nährstofflösung mit einer Konzentration von $0,1 \text{ mM Nitrat}$ und 4 mM Nitrat mit gleicher Ionenstärke verwendet. Die $0,1 \text{ mM Nitratnährlösung}$ enthielt abweichend zu den obigen Tabellen $1201 \mu\text{M CaCl}_2$ and $775 \mu\text{M K}_2\text{SO}_4$, die $4 \text{ mM Nitratnährlösung}$ $1590 \mu\text{M KNO}_3$ und $1206 \mu\text{M Ca}(\text{NO}_3)_2$. Beide Nährlösungen wurden aus den Stammlösungen hergestellt.

5.5.2.2 Kulturschemata für die Hydrokultur

Die Aufzucht der Maispflanzen in Hydrokultur erfolgte mit Hinblick auf das Ziel der jeweiligen Fragestellung nach unterschiedlichen Kulturschemata. Bei Anzucht der Pflanzen für die RNS-Isolation (Abbildung 12) wurden diese kürzer und bei anderen Nitratkonzentrationen im Nährmedium angezogen, als solche deren Gesamtstickstoffgehalt oder deren Lateralwurzeldichte bestimmt wurde (Abbildung 11). Bei dem in Abbildung 11 gezeigten Kulturschema bekommen die Pflanzen das erste Nährmedium einen Tag später als die für die RNS-Isolation angezogenen Pflanzen (Abbildung 12). Bei den Kulturführungen für die Phänotypisierung von Wurzelmerkmalen (Abbildung 11) wurden die Pflanzen länger kultiviert.

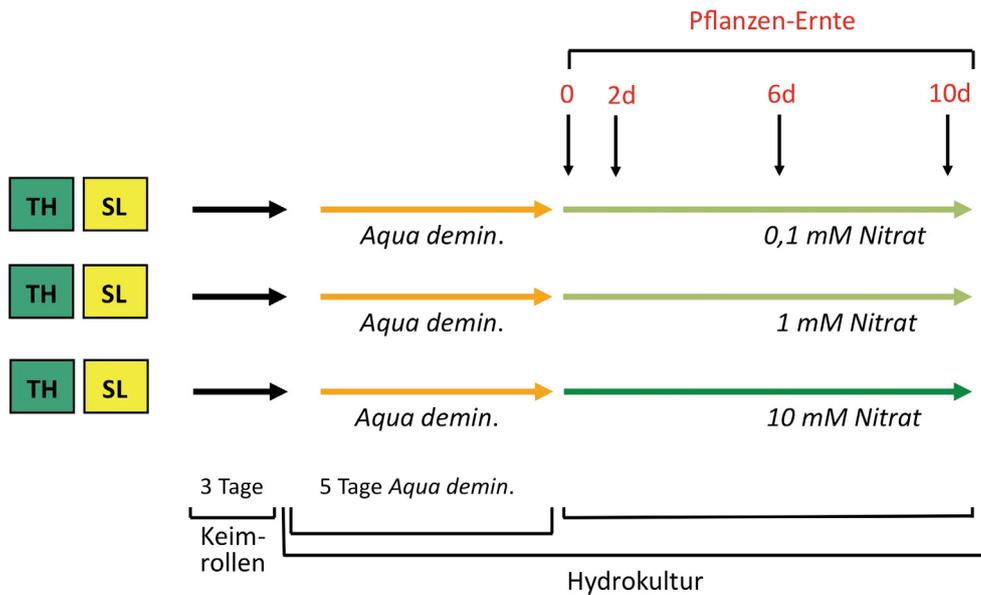


Abbildung 11. Kulturschema der Pflanzen für die Phänotypisierung und Nitratgehaltbestimmung.

Die Abbildung zeigt das Schema, wie die Maispflanzen für die Phänotypisierung und für die Bestimmung des Nitratgehaltes in Hydrokultur angezogen wurden. Die beiden Linien TH und SL, sowie die NIL N8-30X wurden zunächst drei Tage in Keimrollen angekeimt und fünf Tage in der Hydrokultur in reinem Wasser etabliert. Nach der ersten Pflanzenernte am Tag 0 wurden die verschiedenen Nitratlösungen entsprechend der Abbildung zugegeben. Zwei Tage, sechs Tage und zehn Tage später wurden weitere Pflanzen für die genannten Analysezwecke aus der Hydrokultur entnommen.

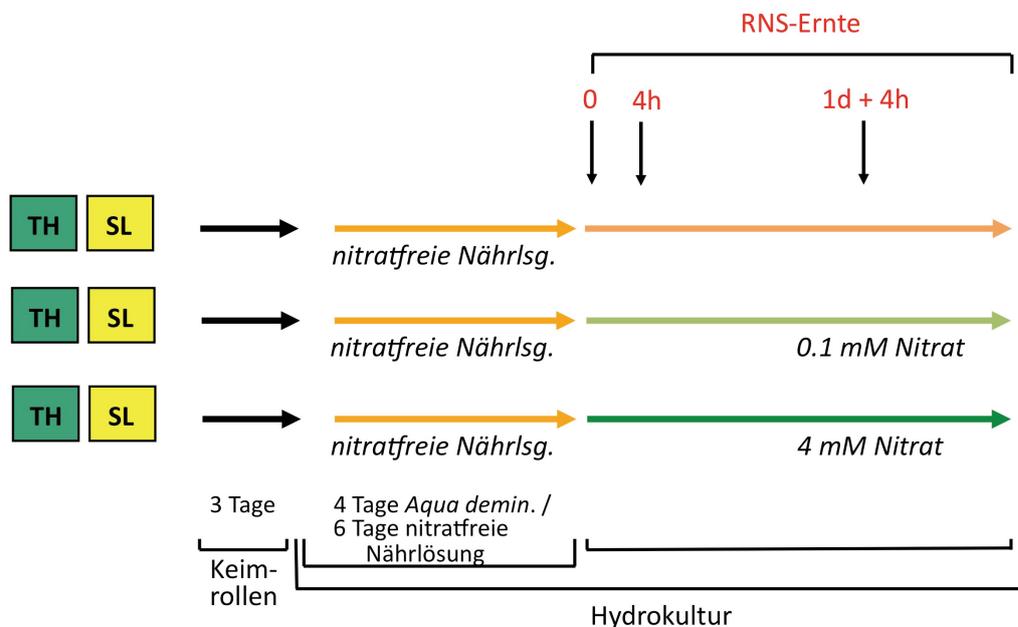


Abbildung 12. Kulturschema der für die RNS-Isolation angezogenen Pflanzen.

Schematische Darstellung, wie Pflanzen für die spätere RNS-Isolation in Hydrokultur angezogen wurden. Die beiden Linien TH und SL wurden zunächst drei Tage in Keimrollen angekeimt, vier Tage in der Hydrokultur in reinem Wasser etabliert und zunächst sechs Tage in einem nitratfreien Vollmedium kultiviert. Nach der

ersten Ernte (Zeitpunkt 0h) wurde die nitratfreie Nährlösung entsprechend der Abbildung gegen drei verschiedene Nährlösungen ausgetauscht. Nach vier Stunden (4h) erfolgte die zweite Ernte. 28 Stunden (1d + 4h) nach Austausch der Nährmedien die dritte Ernte.

5.5.3 Anzucht der Pflanzen in Sand

Für die Kultur unter Bedingungen, die mit den Feldbedingungen möglichst vergleichbar sein sollten, wurde die Kultur der Maissämlinge in Sand etabliert. In mehreren Versuchsreihen (Daten nicht gezeigt) wurde die folgende Methode aufgrund des nachgewiesenen besten Wuchses und der gesündesten Pflanzengestalt entwickelt. Das Beizen des Saatgutes erfolgte wie im Kapitel 5.2.3 beschrieben. Als Substrat wurde Rheinsand vom Botanischen Garten Düsseldorf bezogen. Der Sand wurde in Kunststoffrosentöpfe mit den Maßen 15,7 x 15,7 x 23,3 cm gefüllt. Um ein Fließen des Sandes aus den Löchern des Containersbodens zu vermeiden, wurde dieser mit einem passend zurechtgeschnittenen Stück Gaze ausgelegt. Der erdfeuchte Sand wurde so eingefüllt, dass er möglichst locker war und damit einen hohen Luftgehalt besaß. Die Saattiefe betrug 3–4 cm. Je Container wurden 2 Samen der gleichen Linie ausgebracht. Nach der Aussaat wurden je 60 Töpfe mit 20 l *Aqua demin.* und einer handelsüblichen Gießkanne mit Brausekopf angegossen. Die Anzucht erfolgte randomisiert, um Standorteffekte im Gewächshaus zu vermeiden.

5.5.3.1 Nährlösungen für die Sandkultur

Um definierte Stickstoffbedingungen zu schaffen wurde mit selbst angesetzten Nährlösungen gearbeitet, die manuell dem Sandsubstrat hinzugefügt wurden. Die Zusammensetzung der Nährlösungen basierte auf der Hydrokultur (siehe Tabelle 2). Es wurden mehrere Versuchsreihen (Daten nicht gezeigt) durchgeführt, um die optimale Nährstoffkonzentration zu ermitteln. Für die Experimente in Sand wurden die in Kapitel 5.5.2.1 gezeigten Lösungen verwendet. Diese wurden für die Kultur im Sandsubstrat 3:1 mit *Aqua demin.* verdünnt, da die Pflanzen sonst Symptome für Salzstress zeigten. Dementsprechend betrug die Nitrationenkonzentration beispielsweise bei der 0,1 mM Nitratlösung in dem Fall nur noch 0,075 mM.

5.5.3.2 Kulturschema für die Sandkultur

Die erste Gabe der Nährlösung erfolgte 7 Tage nach Aussaat. Eine zweite Gabe der Nährlösung erfolgte 14 Tage nach Aussaat. Je Topf wurden 200 ml Nährlösung gegeben. Das Kulturschema wird in Abbildung 13 wieder gegeben. Trocknete das Sandsubstrat zwischen den einzelnen Nährlösungsgaben mehr als 5 cm tief aus wurden je 60 Töpfen erneut, wie bei der Aussaat 20 l *Aqua demin.* gegeben.

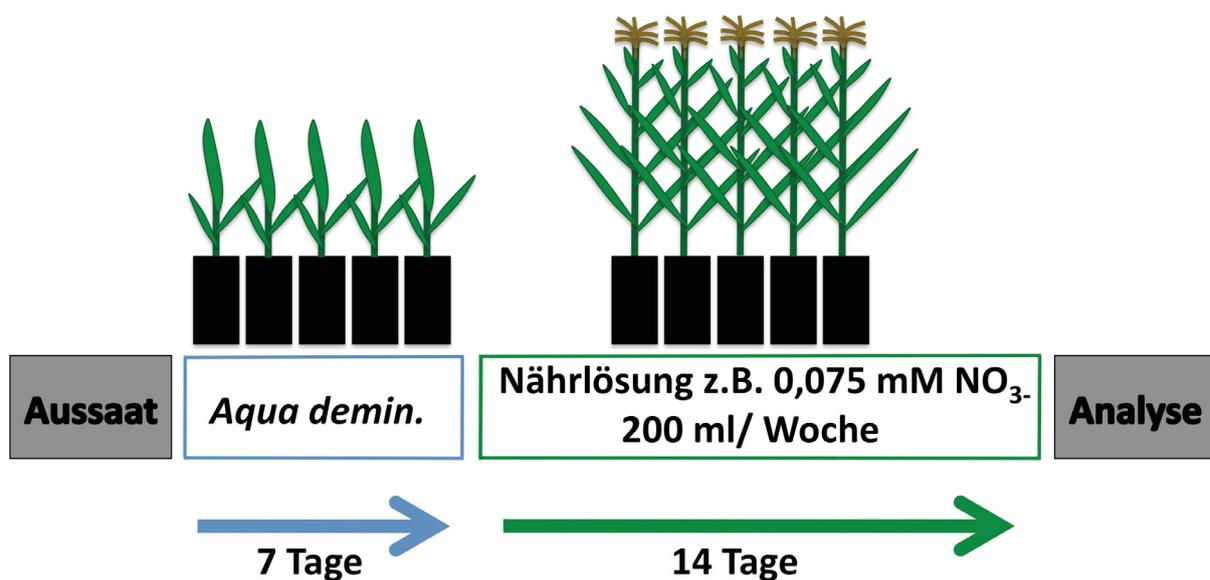


Abbildung 13. Kulturschema im Sandsubstrat mit Nährstofflösung.

Nach der Aussaat wurden die Pflanzen 7 Tage mit *Aqua demin* gegossen. Die Düngung erfolgte während der Versuche durch die wöchentliche Zugabe der entsprechenden Nährlösungen. Nach 21 Tagen Kulturzeit wurden die Pflanzen vermessen und für Wurzelanalysen geerntet.

Die Kultur im Sandsubstrat fand im Gewächshaus statt. Die Bedingungen während der Anzucht waren analog zu denen beschrieben im Kapitel 5.5.2. Um die Wurzelsysteme möglichst unbeschädigt und vollständig aus dem Sand zu befreien, wurden die Kulturcontainer mit den Maisjungpflanzen kopfüber in einen 10 Liter Eimer gegeben. Dabei wurden die Jungpflanzen mit einer Hand so fixiert, dass der Sand unter Wasser langsam aus dem Topf herausfloss. Es wurden nur vollständig erhaltene und unbeschädigte Wurzelsysteme für weitere Analysen verwendet. Die in Sandsubstrat aufgezogenen Pflanzen eröffneten die Möglichkeit der Analyse ganzer und ältere

Wurzelsysteme in einem dem Ackerboden vergleichbaren Substrat. Ein Bild von unter niedriger Stickstoffzufuhr aufgezogenen Pflanzen zeigt die Abbildung 14. Dort sind 18 Tage alte Pflanzen drei Tage vor der Ernte zu sehen.



Abbildung 14. 18 Tage alte Maispflanzen in Sandkultur bei niedriger Stickstoffzufuhr.

Die Pflanzen entwickeln sich ähnlich zu denen in Erdkultur. Die Anzucht erfolgte unter den beschriebenen Gewächshausbedingungen.

5.6 Transkriptomanalyse

5.6.1 Allgemeine Molekularbiologische Methoden

Sämtliche Gefäße und Lösungen wurden - sofern notwendig - autoklaviert bzw. hitzesterilisiert. Alle Lösungen wurden, soweit nicht anders angegeben, mit destilliertem Wasser (*Aqua dest.*) angesetzt.

5.6.2 Isolierung, Quantifizierung und Qualitätskontrolle von RNS, sowie der mRNS Bibliotheken

Für die Isolierung von RNS aus den Wurzeln von *Zea mays* wurden je 4 komplette Wurzelsysteme je Linie und Nährstoffbedingung von den Erntezeitpunkten 0 h, 4 h und 28 h verwendet. Das Ernteschema zeigt die Abbildung 12. Es wurden die Linien SL und TH verwendet. Die Anzucht der Maisjungpflanzen erfolgte wie in den Kapitel 5.5.2 erläutert, mit den dort beschriebenen angewandelten Nährlösungen. Es wurde die RNS von drei unabhängigen Wiederholungen isoliert. Die Isolation wurde nach den folgenden Protokoll durchgeführt (Westhoff et al., 1991). Zusätzlich wurde der Überstand nach der Präzipitation mit 8 M Lithiumchlorid für die Fällung genomischer DNS genutzt.

Die Konzentration und Reinheit der erhaltenen RNS wurde photometrisch mit dem Nanodrop DN-10.000 (Peqlab/VWR, Erlangen, Deutschland) bestimmt. Die RNS wurde im nativen Zustand elektrophorisiert. Hierzu wurde je 1 µg RNS mit Blaumarker auf MOPS-Agarosegele mit zwei Prozent Agarosegehalt aufgetragen und bei 50 V innerhalb von 40–80 Minuten aufgetrennt. Die Ethidiumbromid-Konzentration im Gel betrug 0,5 µg/ml. Als Standard wurden 500 ng einer 1 Kb Leiter aufgetragen (1 Kb Plus DNA Ladder, ThermoFisher Scientific, Waltham, USA).

Mithilfe von Gelelektrophorese wurde überprüft, ob die RNS intakt war und ob die Proben noch mit DNS verunreinigt waren. Intakte RNS zeigt sich durch distinkte Banden der rRNS. Genomische DNS ist aufgrund der Fragmentgröße zu unterscheiden.

Nach der Elektrophorese und der photometrischen Analyse mit dem NanoDrop musste die isolierte Gesamt RNS weiter aufgereinigt werden. Rückstände von DNS wurden durch den Einsatz DNase entfernt. Hierzu wurden 200 µl Gesamt RNA 250 ng/µl mit 22 µl Puffer 10X und 10 U DNase I (Thermo Scientific, USA) versetzt. Nach 15 Minuten Inkubation bei 25 °C, wurde die Reaktion durch das Hinzufügen von jeweils 112,5 µl Phenol und Ethanol gestoppt und eine Minute das geschlossene Reaktionsgefäß geschüttelt. Anschließend wurde bei 10.000 RPM bei Raumtemperatur zentrifugiert (Rotor Universal 30 F, Hettich-Zentrifuge, Firma Hettich, Tuttlingen). Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit einem Volumen Chloroform versetzt, erneut eine Minute geschüttelt und zentrifugiert. Die obere Phase wird

abgenommen und in einem neuen Reaktionsgefäß mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat versetzt, invertiert und mit einem Volumen Isopropanol versetzt. Die RNS wurde über Nacht bei -20 °C gefällt. Das Pellet wurde 30 Minuten bei 10.000 rpm und 4 °C zentrifugiert, mit 1 ml 70% Ethanol gewaschen und erneut für 8 Minuten bei 4 °C und 10.000 rpm sedimentiert. Das Ethanol wird abgenommen und das Pellet kurz getrocknet und anschließend auf Eis in 100 µl *Aqua dest.* rückgelöst. Anschließend wurde das Resultat der Entfernung von DNS durch eine Gelelektrophorese analog zu 5.6.2 überprüft.

Für die Herstellung von RNS-Bibliotheken wird vom Kit-Hersteller die zusätzliche Kontrolle der Proben auf einen Bioanalyser-Chip empfohlen. Hierzu wurden je 8 µl Aliquots der auf eine Konzentration von 250 ng/µl eingestellten Proben an das Biologisch-Medizinische-Forschungszentrum-Düsseldorf (BMFZ) zur Analyse gegeben. Dort wurden die Proben mit Hilfe eines Agilent RNA 6000 Nano Chips auf dem 2100 Bioanalyser (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) analysiert. Siehe auch (Mallmann et al., 2014).

5.6.3 Erstellung der RNS-Bibliotheken und Qualitätskontrolle

Für die insgesamt 42 mRNS-Proben wurden RNS-Bibliotheken hergestellt. Die RNS-Bibliotheken wurden exakt nach dem beiliegenden Protokoll der Reagenziensätze TruSeq® RNA Sample Prep Kit-v2, 48, Set A; TruSeq® SR Cluster Kit v3 cBot™ – HS und TruSeq® SBS KIT v3 – HS (50 CYCLES) der Firma Illumina erstellt. Die Erstellung erfolgte analog zu Mallmann (Mallmann et al., 2014). Es erfolgte eine Analyse durch das BMFZ auf ausreichend hohe RIN-Werte (RNA Integrity Number). Eine Wertskala von 1–10 gab an wie intakt die Kettenlänge der RNS war. Je höher der RIN-Wert desto intakter die RNS (Schroeder et al., 2006). Es wurden nur RNS-Proben verwendet deren RIN-Wert über 8 lag. Wie bei Mallmann beschrieben wurde je Probe 1 µg Gesamt-RNS eingesetzt und die RNS-Bibliotheken erstellt (Mallmann et al., 2014). Als magnetischer Ständer wurde der Ambion® Magnetic stand-96 (ThermoFisher Scientific, Waltham, USA) verwendet.

Die fertig gestellten RNS-Bibliotheken wurden nach Herstellerangaben auf einen Bioanalyser-Chip analysiert. Hierzu wurden die fertigen RNS-Bibliotheken an das BMFZ zur Analyse gegeben. Dort wurden die Proben auf einem Agilent DNA 1000 Chips via Elektrophorese (Bioanalyser) analysiert.

Die Konzentrationsbestimmung der RNS-Bibliotheken wurde vom BMFZ durchgeführt. Mit Hilfe der fluorimetrischen Qubit™-Messungen kann wesentlich spezifischer die Konzentration der RNS-Bibliotheken bestimmt werden.

5.6.4 Sequenzierung der RNS-Bibliotheken

Die fertig erstellten RNS-Bibliotheken wurden sequenziert. Es wurde eine Sequenzierungslänge von 100 bp angestrebt und eine Einzelenden-Sequenzierung mit der Illumina HiSeq2000 durchgeführt. Die Durchführung erfolgte wie bei Mallmann nach den Herstellerangaben (Mallmann et al., 2014). Die Hochdurchsatz-Sequenzierung der RNS-Bibliotheken wurde vom BMFZ durchgeführt. Pro Lane konnten bis 150 Millionen DNS-Fragmente sequenziert werden.

5.6.5 Statistische Auswertung und Filterung der Transkriptomdaten

Die aus der Sequenzierung erhaltenen Datensätze der 42 Einzelproben wurden zunächst mit Hilfe des Programms CLC V8.0.1 (Qiagen, Hilden, Deutschland) auf die von der Linie B73 bekannten Gene inklusive der 500 Basenpaare flankierenden Sequenzen und die bekannten Transkripte annotiert. Die sequenzierten DNS-Stücke waren durchschnittlich 100 bp lang. Für die Wahl geeigneter Parameter wurden zunächst nur die Datensätze der Experimente zum Zeitpunkt 0 h und damit vor der Nitratzugabe analysiert. Anhand der erhaltenen Resultate, sowie Angaben aus der Literatur für vergleichbare Experimente, wurden für die eigenen Daten folgende Stringenz bei den Einstellung gewählt:

Fragmentlänge 90 bp

Ähnlichkeit 90 %

Die Originalwerte wurden mit dem Logarithmus von 10 transformiert und normalisiert (Quantil). Anschließend wurde eine Hauptkomponentenanalyse (PCA, Principal Component Analysis) durchgeführt und die einzelnen Datensätze als Boxplot (nicht gezeigt) dargestellt und bewertet, ob diese untereinander vergleichbar sind.

Es wurde ein Experiment aufgesetzt bei dem alle regulären Datenpunkte verglichen wurden und auf differentiell exprimierten Gene („differentially expressed genes“ – DEGs) hin analysiert. Die p-Werte wurden mit der Bonferroni-Methode korrigiert.

Alle Gene die bei keiner der analysierten Proben einen RPKM < 1 („Reads Per Kilobase per Million mapped reads“) zeigten wurden aussortiert. Der Schwellenwert von einem RPKM < 1 wurde gewählt, um sehr schwach exprimierte Genregionen herauszufiltern, die möglicherweise Artefakte der Methode selbst sein können (Liu et al., 2013). Anschließend wurde die Tabelle in das Programm Excel exportiert. Innerhalb von Excel wurden die Daten weitergehend sortiert. Für die weiteren Analysen wurde in Excel die Gene herausgefiltert, die keine Signifikanz in einem der möglichen Vergleiche zwischen oder innerhalb der Maislinien für die Bonferroni-Korrektur zeigten.

Die derart gefilterten Genlisten wurden als Text-Dateien in das Programm MeV geladen um dort weiter analysiert zu werden. Im Programm MeV wurden Clusteranalysen durchgeführt. Hierzu wurden die Daten mit dem Logarithmus von 2 transformiert und anschließend aufgrund der Ergebnisse von Hierarchischen Clusteranalysen und der Erwartungshaltung anhand der Anzahl der Zeitpunkte und Nitratbedingungen die Anzahl der zu erwartenden k-Gruppen bestimmt. Auf Grundlage dieser Daten wurde ein k-Means-Clusteranalyse durchgeführt. Die k-Means wurden in 100 Rechenversuchen und dem Korrelationskoeffizienten nach Pearson berechnet. Die Gene eines Clusters wurden wiederum als Text-Datei abgespeichert und erneut in eine Exceltabelle umgewandelt.

Diese Datensätze wurden mit dem Internetservice und der Datenbank von AgriGO (Du et al., 2010) weiter analysiert. Die Cluster wurden auf ihre Genontologie (SEA Singular Enrichment Analysis) hin untersucht. Als Referenz dienten die zur Verfügung gestellten Daten der Maize genome V5a transcript ID. Als statistische Testmethode der Signifikanz

wurde Fisher und mit Hilfe der Benjamini-Hochberg-Prozedur (False Discovery Rate FDR) die Rate der falsch positiven Tests bestimmt.

5.6.6 Verifizierung der analysierten Maislinien mittels genetischer Marker

In Rahmen der Erzeugung des Maissaatgutes kann es zu ungewollten Bestäubungen oder Verwechslungen innerhalb der Linien kommen. Um ungewollte Verwechslungen der Versuchspflanzen zu vermeiden, wurden alle für die Transkriptomanalyse verwendeten Pflanzen mit genetischen SSR-Markern auf deren Genotyp hin untersucht. Diese SSR- Marker nutzen sogenannte Mikrosatelliten. Mikrosatelliten sind meist kurze sich wiederholende Basenfolgen in nicht kodierenden Sequenzbereichen (Hamada et al., 1982). Unterschiede in der Anzahl der Wiederholungen können zur Unterscheidung zweier Genotypen beitragen. Hierzu wird die Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction) dazu genutzt *in-vitro* DNS zu amplifizieren. Dabei werden durch die Verwendung von definierten, die Mikrosatelliten flankierende Oligonukleotidpaaren, spezifische DNS-Fragmente amplifiziert. Durch die Wahl der Oligonukleotidsequenzen werden die Bindungsstellen an der DNS-Matrize bestimmt, so dass es möglich ist, Fragmente mit einer festgelegten Größe für jeden Genotyp zu erhalten. Als Matrize für die Fragmente dient ein DNS-Stück, auf welchem die Oligonukleotide möglichst spezifische Bindestellen haben sollten (Nybom et al., 2014).

Die genomische DNS wurde aus dem Überstand nach der 8 M Lithiumchloridfällung (siehe Kapitel 5.6.2) isoliert. Hierzu wurden je 600 µl Überstand mit einem Volumen Isopropanol versetzt, gevortext und bei Raumtemperatur gefällt. Die DNS wurde bei 13.000 rpm und Raumtemperatur für 5 Minuten zentrifugiert, mit 1 ml 70%igen Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert, bei Raumtemperatur getrocknet und in 200 µl *Aqua dest.* gelöst.

Die Konzentration der DNS wurde mit dem NanoDrop bestimmt und auf 25 ng/µL eingestellt. Die Qualität der DNS wurde auf durch eine Gelelektrophorese festgestellt. Hierzu wurden je 100 ng eingestellte DNS auf einem einprozentigen TBE-Agarosegel (1x TBE: 90 mM Tris, 90 mM Borsäure und 1 mM EDTA, pH 8,3 und 1 % Agarose) bei 100 V

aufgetrennt. Die Ethidiumbromid-Konzentration im Gel betrug 0,5 µg/ml. Als Vergleichsstandard diente 500 ng 1-kb-Größenstandard.

Die PCRs erfolgten im Thermozykler der Firma Applied Biosystems (Typ GeneAmp PCR System 2700, Foster City, USA)

SSR-Marker umc1336 (PCR-Protokoll mit der im Institut hergestellten *Taq*-Polymerase):

PCR-Puffer 1 x, je Oligonukleotidlösung 0,44 µM, DNS 3,3 ng/µl, dNTPs 100 µM,
Taq-Polymerase 0,15 U/µl

Jede Reaktion startet mit der Denaturierung der DNS-Stränge durch 5-minütiges Erhitzen auf 94 °C. Darauf folgten 40 Zyklen aus folgenden Teilschritten:

15 Sek. 94 °C, Denaturierung

15 Sek. 58 °C, Oligonukleotidanlagerung

60 Sek. 72 °C, Elongation

Den 40 Zyklen folgte eine 4-minütige Verlängerungsphase bei 72 °C. Die PCR-Produkte wurden nach der Reaktion auf 4 °C gekühlt.

Beim Marker 164-44P51/50 wurde unter Verwendung der Phusion-High-Fidelity-DNS-Polymerase nach folgendem PCR-Protokoll gearbeitet:

PCR-GC-Puffer 1 x, je Oligonukleotidlösung 0,13 µM, DNS 1,6 ng/µl, dNTPs 133 µM, Phusion-High-Fidelity-DNS-Polymerase 0,02 U/µl

Die Reaktion startet mit der Denaturierung der DNS-Stränge durch 2-minütiges Erhitzen auf 98 °C. Darauf folgten 35 Zyklen aus folgenden Teilschritten:

30 Sek. 98 °C, Denaturierung

30 Sek. 58 °C, Oligonukleotidanlagerung

30 Sek. 72 °C, Elongation

Den 35 Zyklen folgte eine 5-minütige Verlängerungsphase bei 72 °C. Die Produkte wurden nach der Reaktion auf 4 °C gekühlt.

Die Produkte wurden mittels Gelelektrophorese auf Produktmenge und Nebenprodukte hin analysiert. Dazu wurden je 12 μl des PCR-Produktes auf abhängig von der erwarteten PCR-Produktgröße auf TBE-Agarosegel mit angepasstem Agarosegehalt bei 100 mV für 1 h aufgetrennt.

6 Ergebnisse

6.1 Methoden für Wurzelsystemanalysen von *Zea mays*

6.1.1 Etablierung der Kultur von Maispflanzen in Sand

Die Analyse von Wurzelsystemen geht stets mit der Problematik der nur eingeschränkten Erfassbarkeit dieses im Erdreich verankerten Organs einher. Die meisten Methoden sind destruktiv, wenig akkurat oder extrem artifiziell (4.6). Im Rahmen dieser Dissertation sollte eine möglichst den Feldbedingungen ähnliche Methode für die Anzucht von *Zea mays* etabliert werden. In dem etablierten System werden die Pflanzen in Sand gezogen und der Sand in einem Putzeimer mit Wasser bei Entnahmewunsch entfernt (siehe 6.1.1). Gleichzeitig, sollte das etablierte System die Wurzelsysteme der Pflanzen intakt freilegbar machen und damit auch analysierbar machen.

6.1.2 Verifizierung der Messung der elektrischen Kapazität von Maiswurzeln als Methode zur *in-situ* Phänotypisierung auf dem Feld

Die Messung der elektrischen Kapazität von Wurzeln stellt eine der wenigen Möglichkeiten der Phänotypisierung von Wurzelsystemen auf dem Feld dar, ohne die Pflanzen dabei zu beschädigen. Für Mais sind Studien insbesondere im Rahmen von Gefäßversuchen bekannt. In dieser Dissertation sollte geklärt werden, ob diese Methode auch für die Maislinien SL und TH auf dem Feld angewendet werden kann. Es galt die Frage zu klären, ob sich die Unterschiede im Wachstumsverhalten und in der Wurzelarchitektur durch die Bestimmung der elektrischen Kapazität quantifizieren ließen. Für Linien mit Wurzelsystemen mit besonders großen Oberflächen würde man hohe elektrische Kapazitäten des Wurzelsystems erwarten. Zeigte also das nährstoffnutzeffizientere Wurzelsystem aufgrund von mehr Lateralwurzeln oder anderer Effekte höhere nF-Werte als Maß der elektrischen Kapazität? Ließ sich diese Vermutung auch bei den NILs verfolgen? Des Weiteren sollte in Gefäßversuchen geklärt

werden, welche Bestandteile der Wurzelsysteme der Maislinien durch die Messung der elektrischen Kapazität wieder gegeben werden, um so die Ergebnisse der Versuche auf dem Feld später zu verifizieren. Die Experimente wurden mit den Elternlinien (SL und TH), sowie NILs für mit SL-Introgressionen für im Bereich von QTL 8 oder QTL 10 (alte Berechnung) mit TH als rekurrenten Elter gemacht (siehe Kapitel 4.7.2). Die Markersituation für die verwendeten NILs im Bereich des QTLs 10 ist der Abbildung 27 zu entnehmen. SL-N10-1 und SL-N10-2 deckten beide jeweils die alte berechnete QTL-Region und die neu berechnete zum größten Teil ab. Die Lage der SL-Introgressionen im Bereich des QTLs 8 wird in der Abbildung 15 gezeigt. Hier sind alter und neu berechneter Ertrags-QTL nicht deckungsgleich. Die Elternlinien SL und TH zeigten wie erwartet einheitlich ihren Genotyp. Die NILs SL-N8-3HX, SL-N8-26X, SL-N8-40X, SL-N8-30X und SL-N8-32X zeigen verschieden große Introgressionen von SL auf den gezeigten Abschnitt von Chromosom 8. Die NILs SL-N10-1 und SL-N10-2, beide mit SL-Introgressionen auf dem Chromosom 10 (siehe Abbildung 27), untersuchten Bereich identisch mit dem rekurrenten Elter TH. Der rot markierte Bereich gibt den alten Kornertrags-QTL bei niedriger Stickstoffzufuhr auf Chromosom 8 wieder, der blaue Bereich den neuen QTL.

Es wurden zwei unabhängige Experimente jeweils im Jahr 2010 und 2012 durchgeführt. Es wurden jeweils Pflanzen aus verschiedenen Parzellen der einzelnen Wiederholungen gemessen. Die im Jahr 2010 erhobenen Daten basierten je Linie und Bedingung auf 40–60 Einzelmessungen, die erhobenen Daten für 2012 auf jeweils 30 Einzelbestimmungen. Die Auswahl der Pflanzen zur Analyse in den Feldversuchen mit Introgressionen auf dem Chromosom 8 erfolgte auf der Datengrundlage der Berechnung des alten QTL-Locus. Die Ergebnisse dieser Bestimmungen sind in der Abbildung 16 zu sehen.

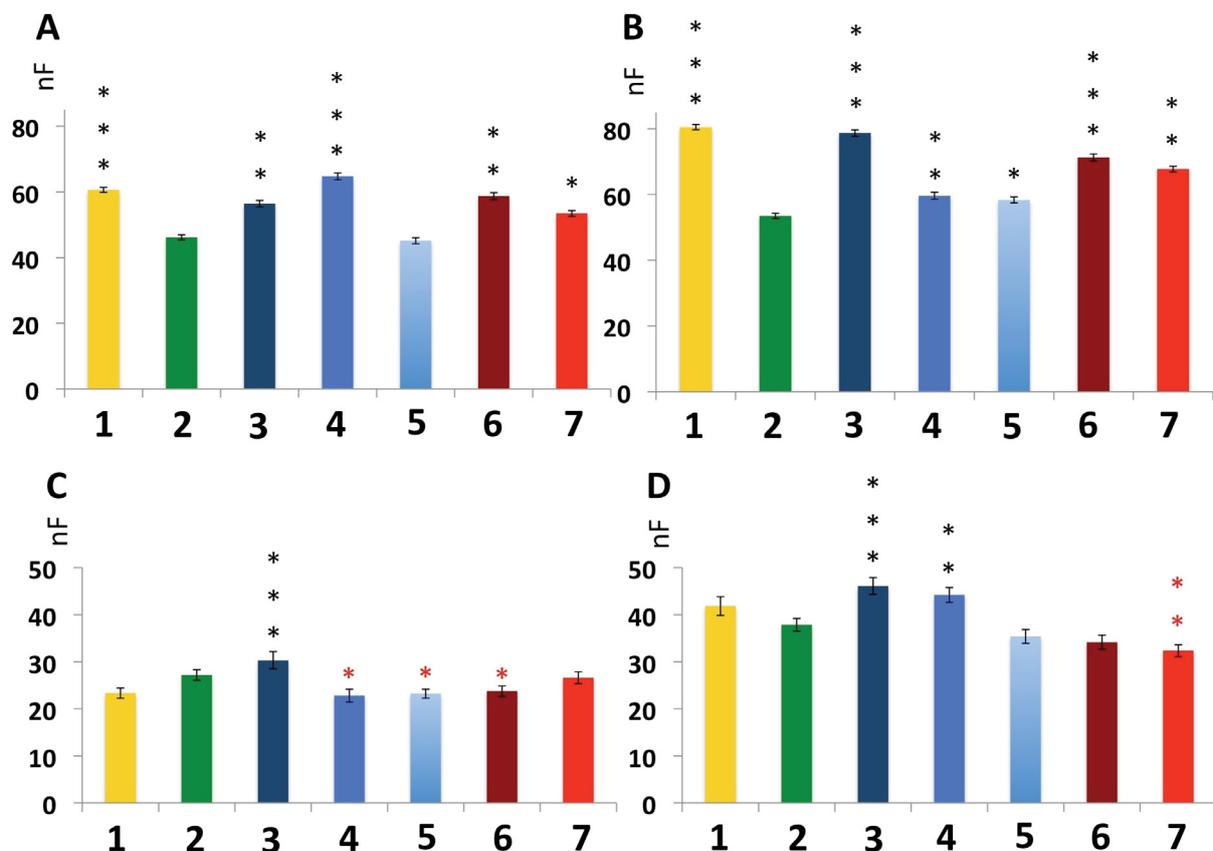


Abbildung 16. Ergebnisse der Messung der elektrischen Kapazität der Wurzelsysteme bei unterschiedlicher Stickstoffzufuhr im Feld.

Die Messung der elektrischen Kapazität von Wurzelsystemen wurde auf dem Versuchsfeld in Grucking (Bayern) in den Jahren 2010 (a und B) und 2012 (C und D) bei niedriger (A und C) oder hoher Stickstoffzufuhr (B und D) gemessen. Es sind jeweils die Mittelwerte in Nanofarad (nF) angegeben. Die Linien sind durchnummeriert: 1, SL; 2, TH; 3, SL-N8-3HX; 4, SL-N8-26X; 5, SL-N8-40X; 6, SL-N10-1; 7, SL-10-2. Der Fehlerbalken gibt den Standardfehler an. Die schwarzen Sterne geben die signifikant höheren Werte gegenüber dem rekurrenten Elter TH an. Die roten Sterne geben die signifikant niedrigeren Werte gegenüber der Linie TH wieder. Je Linie, Jahr und Bedingung wurden 30–60 Einzelmessungen durchgeführt. 0,1% = ***, 1% = **, 5% = *

Die Abbildung 16 zeigt deutliche Unterschiede für die Messungen in den beiden Jahren. Betrachtet man die für die Jahr 2010 (Diagramme A und B, Abbildung 16) und 2012 (Diagramm C und D, Abbildung 16) erhobenen Daten, fällt zunächst ein deutlicher Unterschied zwischen der Höhe der Werte auf. Im Jahr 2012 waren sie zum Teil um 50 % kleiner und dies bei beiden Nitratbedingungen. Während es im Jahr 2010 viele Linien gab, welche sowohl bei hoher als auch niedriger Stickstoffzufuhr im Mittel hoch signifikant höhere nF-Werte aufwiesen als die Linie TH, traf dies im Jahr 2012 nur für die Linie SL-N8-3HX zu. Ausschließlich die Linie SL-N8-26X zeigte bei hoher Stickstoffzufuhr 2012 signifikant höhere nF-Werte als der rekurrente Elter TH. Einige NILs zeigten sogar leicht signifikant niedrigere elektrische Kapazitäten für ihre Wurzelsysteme gegenüber TH. Auch signifikante der Trend der höheren elektrischen der stickstoffnutzeffizienteren Linie SL aus dem Versuchsjahr 2010, ist 2012 nur bei hohen Stickstoffbedingungen zu erahnen, bei niedriger Stickstoffzufuhr sogar gegenteilig. Betrachtet man die Auswahl der analysierten Genotypen (siehe Abbildung 15 und Abbildung 27) würde man erwarten, dass einige NILs mit ähnlichem Genotyp gleichzeitig größere Kapazitätswerte zeigen sollten, soweit auch SL durch eine größere Wurzeloberfläche konstant höhere nF-Werte aufweist und zumindest einer der beiden Ertrags-QTLs genetisch Einfluss auf die Wurzeloberfläche nimmt. Der Elter SL zeigte selbst keine konstanten Tendenzen über alle Messungen und nur die NIL SL-N8-3HX zeichnete sich durch beständig signifikant höhere nF-Werte als TH. Die NIL SL-N8-26X zeigte nur bei hoher Nitratzufuhr signifikant höhere Kapazitätswerte für ihr Wurzelsystem. Betrachtet man den Genotyp der NIL SL-N8-3HX sollte sich zumindest SL-N8-26X zu allen Bedingungen identisch verhalten, auch wenn beide Linien den neu berechneten QTL-Locus (blauer Kasten, Abbildung 15) nur teilweise enthalten. Gleiches gilt auch für die NILs SL-N10-1 und SL-N10-2. Beide Linien zeigen wie SL nur im Versuchsjahr 2010 konstant höhere elektrische Wurzelkapazitäten als TH. Als ein allgemeingültiger Trend lässt sich für beide Jahre eine steigende elektrische Kapazität der Wurzelsysteme bei steigender Nährstoffzufuhr festhalten. Dieser Anstieg fällt bei TH deutlich niedriger als bei SL aus. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine Unterscheidung der Elternlinien mittels der elektrischen Kapazität aufgrund der inkonstanten Ergebnisse nicht in beiden Versuchsjahren möglich war. Die NILs mit vergleichbaren Introgressionen zeigten teils widersprüchliche oder gleichfalls nicht konstante Ergebnisse bei der Bestimmung der elektrischen Wurzelkapazität.

Die Wurzelsysteme aus dem Feldversuch lassen sich nicht vollständig bergen und so bleibt nur zu spekulieren, ob die Linien unterschiedlich große Wurzelsystemoberflächen aufweisen oder die Unterschiede in der Methode selbst begründet sind. Wie genau und konstant die Messung der Wurzelkapazität für die analysierten Maislinien ist, soll durch Versuche in Gefäßen und Sandkultur gezeigt werden.

6.1.4 Messung der elektrischen Kapazität von Wurzeln unter kontrollierten Gewächshausbedingungen im Gefäßversuch

Um die im Kapitel 6.1.3 erhaltenen Ergebnisse besser verifizieren zu können und um abschätzen zu können, ob die erhaltenen Werte der Kapazität auch bei den hier analysierten Maislinien mit der Wurzeloberfläche korreliert, wurden im Gewächshaus Pflanzen in Gefäßen angezogen. Die Kultur erfolgte unter niedriger Stickstoffzufuhr wie im Kapitel 5.5.3 beschrieben. Die verwendeten Genotypen sind in der Übersicht der Abbildung 15 und in den Genotyp-Übersichten der Kartierungen der Kronwurzelaustrittswinkel (Kapitel 6.2.4 und 6.2.5) für die QTLs 8 und 10 gezeigt. Von diesen wurde unter kontrollierten Bedingungen die elektrische Kapazität der Wurzeln bestimmt (Kapitel 5.3.4). Anschließend wurden die Wurzelsysteme mit dem Programm WinRHIZO™ wie unter 5.3.3 beschrieben analysiert. Die Ergebnisse der Messungen der elektrischen Kapazität der drei Wochen alten Wurzelsysteme zeigt die Abbildung 17.

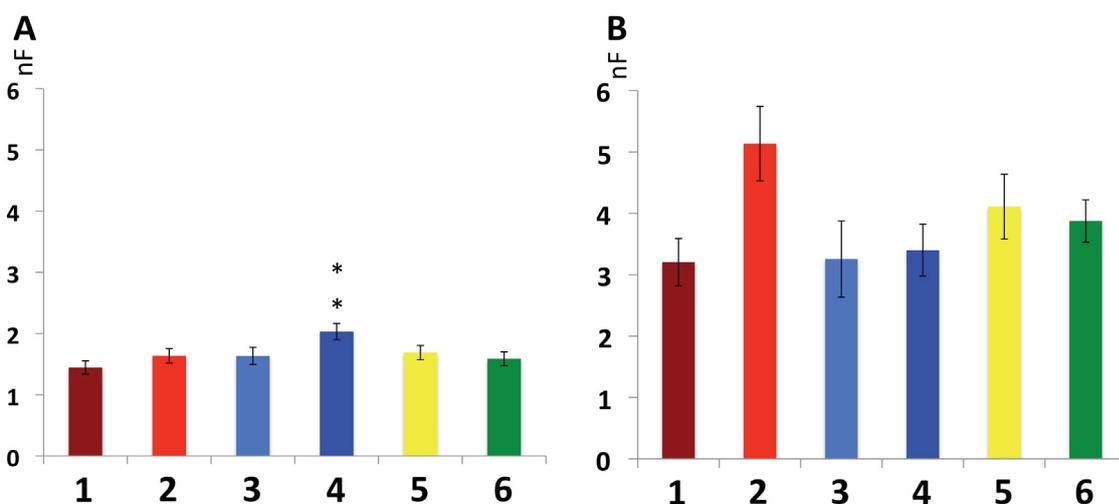


Abbildung 17. Ergebnisse der Messung der elektrischen Kapazität der Wurzelsysteme bei niedriger Stickstoffzufuhr im Gefäßversuch unter Gewächshausbedingungen.

Die Abbildung zeigt die Ergebnisse der Messung der elektrischen Kapazität von Wurzelsystemen im

Gefäßversuch unter Gewächshausbedingungen und bei niedriger Stickstoffzufuhr für die Experimente 1 und 2 (A) sowie 3 und 4 (B). Die Experimente 1 und 2 bzw. 3 und 4 wurden jeweils mit den gleichen Saatgutchargen zwei Tage versetzt durchgeführt. Aufgrund der zeitlichen Nähe der Durchführung sind jeweils die zusammengefassten Mittelwerte in Nanofarad (nF) angegeben. Die Linien sind durchnummeriert: 1, SL-N10-1; 2, SL-10-2; 3, SL-N8-30X; 4, SL-N8-32X; 5, SL; 6, TH. Der Fehlerbalken gibt den Standardfehler an. Die schwarzen Sterne geben die signifikant höheren Werte gegenüber dem rekurrenten Elter TH an (** $\alpha \leq 1\%$). Je Linie wurden 30–40 Einzelmessungen durchgeführt.

Vergleicht man die Mittelwerte von Diagramm A mit denen von B, so sind diese von B durchschnittlich etwa doppelt so hoch wie die von A. Zwischen den Elternlinien TH und SL konnten keine signifikanten Unterschiede bezüglich der elektrischen Kapazität der Wurzelsysteme in einem der beiden Versuchsblöcke festgestellt werden. Nur für die Linie SL-N8-32X konnten signifikant höhere nF-Werte für die Experimente 1 und 2 gemessen werden. Diese NIL besitzt als einzige eine Introgression weit über den alten und neuen Ertrags-QTL 8 hinaus. Das Verhalten zeigte sich aber nicht bei der zweiten Saatgutcharge der Experimente 3 und 4. Zusammenfassend ließen sich im Alter von drei Wochen wurden trotz kontrollierter Bedingungen starke Schwankungen zwischen den beiden Experimentblöcken feststellen. Unterschiede zwischen den Eltern konnten nicht gefunden werden.

Für beide Elternlinien konnten in diesem juvenilen Stadium Unterschiede in der Wurzelarchitektur festgestellt werden. Diese resultierten im Alter von drei Wochen aber nicht in signifikanten Unterschieden in der elektrischen Kapazität. Die Kapazität von Wurzeln soll laut Literatur mit deren Oberfläche dieser korrelieren. Um dies für die Maislinien zu untersuchen, wurden die Wurzelsysteme mit WinRHIZO™ analysiert. Durch diese Methode sollte auch überprüft werden, ob die elektrische Kapazität der Wurzelsysteme mit weiteren Merkmalen korreliert. Die Ergebnisse für die Experimente 1 und 2 sind zusammengefasst in der Abbildung 18 gezeigt. Die Analysen zeigten, dass auch bei den im Rahmen dieser Dissertation untersuchten Maislinien, die elektrische Kapazität von Wurzelsystemen deren Gesamtoberfläche wiedergab. Gleichzeitig zeigten die Ergebnisse auch, dass die Methode der Erfassung der elektrischen Kapazität nicht zwingend die Beschaffenheit und den Charakter der Wurzelarchitektur wieder spiegelte. Beide Eltern erreichten eine Gesamtlänge der Wurzelsysteme von etwa 1000–1150 cm (Abbildung 18 D). Allerdings besaß der Elter SL hoch signifikant mehr dünnere Wurzeln als dickere Wurzeln im Vergleich zum Elter TH (Abbildung 18 C), bei einer gleichzeitig

ähnlich großen Oberfläche (Abbildung 18 Diagramm B). Die unterschiedlichen morphologischen Eigenschaften der Wurzeln spielten also keine Rolle für die Größe der elektrischen Kapazität von Wurzeln.

Insgesamt zeigte die Messung der elektrischen Kapazität von Wurzelsystemen unter kontrollierten Bedingungen für die untersuchten Maislinien eine gute Korrelation zur ebenfalls bestimmten Wurzeloberfläche der analysierten Wurzelsysteme. Unterschiede bezüglich der Wurzelarchitektur werden durch die Bestimmung der elektrischen Kapazität nicht berücksichtigt. Hohe Wurzeloberflächen und damit auch hohe nF-Werte können sowohl durch eine größere Anzahl großer axialer Wurzeln als auch durch feine Lateralwurzeln erreicht werden.

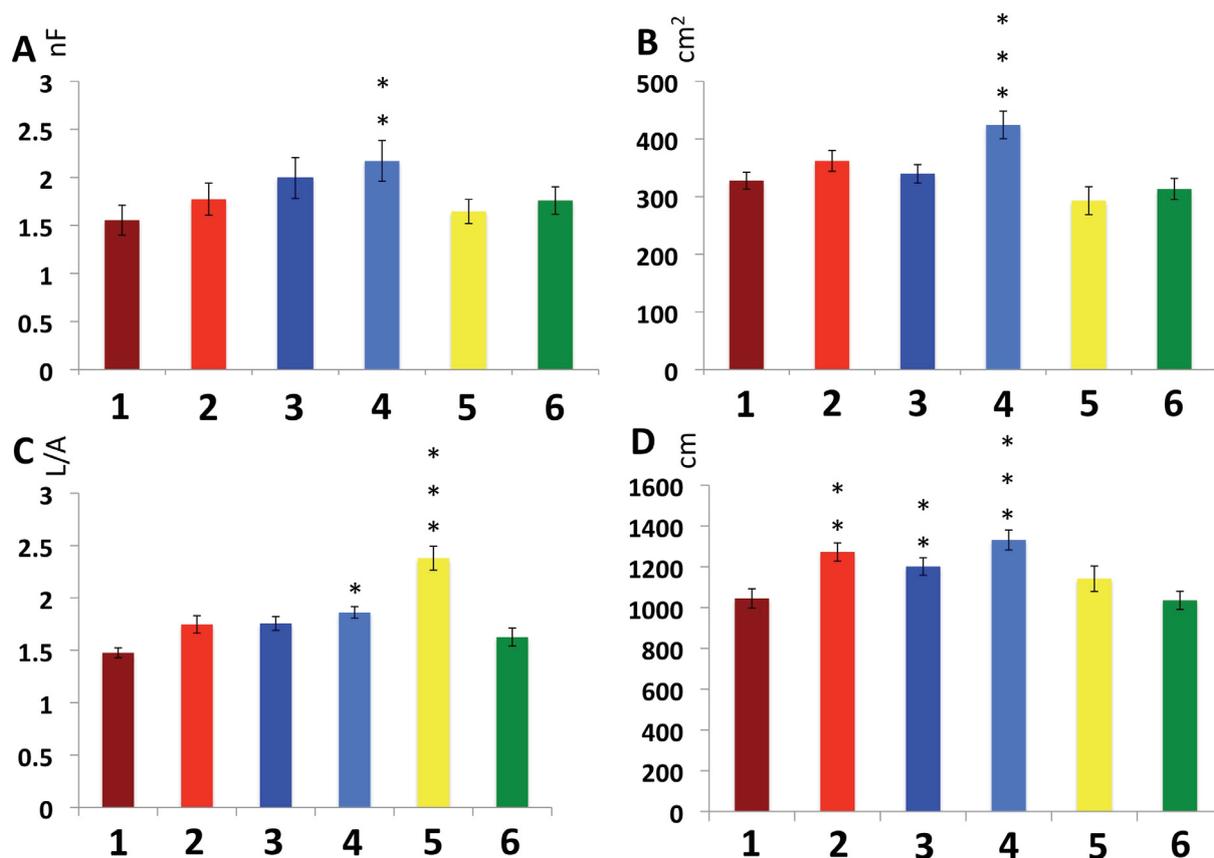


Abbildung 18. Ergebnisse der Bestimmung verschiedener Eigenschaften der Wurzelsysteme 3 Wochen alter Maispflanzen in Sandkultur bei niedriger Stickstoffzufuhr.

Die Abbildung zeigt die Ergebnisse der Bestimmung der elektrischen Kapazität von Wurzelsystemen (A; Mittelwerte in Nanofarad [nF]), deren mittels WinRHIZO™ bestimmte Gesamtoberfläche (B), das Verhältnis von Lateral- und Axialwurzeln (C) und die Mittelwerte der Gesamtwurzellänge (D). Das Verhältnis von Lateral- zu den axialen Hauptwurzeln (L/A) wurde anhand der von WinRHIZO™ ermittelten Wurzeldurchmesser berechnet. Die Linien sind nummeriert: 1, SL-N10-1; 2, SL-10-2; 3, SL-N8-30X; 4, SL-N8-32X; 5, SL; 6, TH. Der Fehlerbalken gibt den Standardfehler an. Die schwarzen Sterne geben die signifikant höheren Werte gegenüber dem rekurrenten Elter TH an. Je Linie wurden 29–40 Einzelmessungen durchgeführt. 0,1% = ***; 1% = **; 5% = *

6.2 Genetische Analyse der Wurzelarchitektur bei *Zea mays*

6.2.1 Die Kron- und Stützwurzelarchitektur von SL und TH unterscheidet sich unter Feldbedingungen

Die Maisinzuchtlinien SL und TH unterscheiden sich gravierend bezüglich der Kornertragsstabilität bei niedriger Stickstoffzufuhr. Bei niedriger Stickstoffzufuhr bricht der Ertrag der Linie TH stark ein. Der Kornertrag der Linie SL bleibt dagegen auch bei Nitratmangel weitestgehend konstant. Ein Ziel dieser Arbeit war es, einen phänotypischen Unterschied zu finden, der dieses differentielle Ertragsverhalten erklärt. Zu Beginn der Arbeiten dieser Dissertation waren nicht für beide wesentliche Kornertrag-QTL bei Stickstoffmangelbedingungen (siehe 4.7 und 4.7.1) mögliche korrespondierende Phänotypen bekannt. Für den QTL auf dem Chromosom 8 wurde in einer vorhergegangenen Arbeit in der Hydrokultur ein Phänotyp für eine höhere Lateralwurzeldichte der Primärwurzel gefunden, der im errechneten Intervall des Ertrags-QTL zu liegen schien (Gou et al., unveröffentlicht). Für den zweiten nur bei niedrigen Stickstoffbedingungen wirksamen Ertrags-QTL auf dem Chromosom 10 war kein Phänotyp bekannt, der für diesen Mehrertrag verantwortlich sein könnte.

Bei der Erhebung der Messdaten der elektrischen Kapazität für die in Grucking (Bayern) aufgepflanzten Linien im August 2010 wurde ein wesentlicher Unterschied zwischen den beiden Elternlinien TH und SL bezüglich der Architektur der sichtbaren Kron- und Stützwurzeln aufgedeckt. Beide Linien zeigten konträre Entwicklungen. TH zeigte am ersten sichtbaren Nodium ein sehr ausgeprägtes Kronwurzelwachstum senkrecht in den Boden. Die weiteren beiden höher liegenden Nodien zeigten eine starke Ausbildung und große Anzahl von Stützwurzeln, welche ebenfalls nahezu senkrecht Richtung Feldboden orientiert waren (Abbildung 19 B). Bei der Kronwurzelausbildung am ersten sichtbaren Nodium verhielt sich die Linie SL gänzlich anders: ihre Wurzeln zeigten eine wesentlich horizontalere Orientierung. An den weiteren höher gelegen Nodien bildete die Linie SL kaum oder nur sehr rudimentär Stützwurzeln aus (Abbildung 19 b).



Abbildung 19. Die Ausbildung der Kron- und Stützwurzeln bei den Elternlinien SL und TH im Feld in Grucking. Vergleich der oberirdisch sichtbaren Wurzelmasse beider Elternlinien, SL (A) und TH (B), auf Linienniveau am Versuchsstandort Grucking. Der Elter TH bildet wesentlich mehr und steilere Stützwurzeln aus als SL. Die Pflanzen wuchsen unter hoher Stickstoffzufuhr.

6.2.2 Liegen die Gene für die Unterschiede in der Kron- und Stützwurzelarchitektur von SL und TH in einem der beiden Ertrags-QTL?

Nach der Feststellung dieses Unterschiedes der Kron- und Stützwurzelarchitektur zwischen den Elternlinien SL und TH galt es zu klären, ob die verantwortlichen Gene hierfür in einem der beiden QTL-Bereiche liegen.

Beim genaueren Beobachten der NILs mit QTL-Introgressionen fiel auf, dass sich die Linien SL-N10-1 und SL-N10-2 deutlich von den anderen NILs unterschieden. Diese Linien, welche eine Introgression des QTL-Bereiches 10 vom Donorelter SL trugen, zeigten eine andere Wurzelarchitektur als diese mit der Introgression vom Chromosom 8 des Elters SL (Abbildung 20). Die NILs, den QTL 8 besaßen, zeigten eine Wurzelarchitektur ähnlich der des Elters TH (Abbildung 20 A, B). NILs mit dem QTL 10 zeigten dagegen eine Ausbildung der Kron- und Stützwurzeln wie SL (Abbildung 20 C, D).

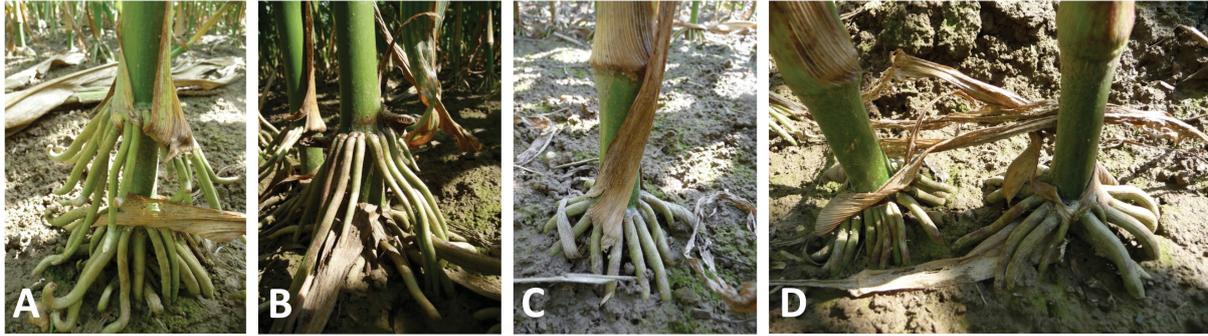


Abbildung 20. Kron- und Stützwurzeln von Linien mit unterschiedlichen QTL-Introgressionen unter hohen Stickstoffbedingungen.

Gezeigt sind die Stützwurzeln verschiedener NILs, die unterschiedliche QTL-Introgressionen enthalten. Die Linien SL-N8-3HX (A) und SL-N8-40X (B) enthalten jeweils eine Introgression des QTL-Bereiches des Chromosomes 8, wobei SL als Donorelter und TH als rekurrenter Elter verwendet wurde. Die Wurzelarchitektur ähnelt stark dem Elter TH. Die Linien SL-N10-1 (C) und SL-N10-2 (D) tragen die QTL-Region 10 in sich. Ihre Wurzelarchitektur ist der des Donorelters SL ähnlicher.

Diese Beobachtung wurde zunächst unter regulären und damit hohen Stickstoffbedingungen gemacht. Deshalb wurde überprüft, ob sich diese Beobachtung im benachbarten Feldversuch unter niedrigen Stickstoffbedingungen wiederholen konnte. Das Ergebnis dieser Überprüfung zeigt die Abbildung 21. Dort sind sowohl die Elternlinien SL und TH, als auch die in Abbildung 20 gezeigten Genotypen zu sehen. Man sieht, dass der durch die QTL-Region 10 verursachte Effekt auch unter niedrigen Stickstoffbedingungen vorhanden ist. Der während der Feldversuche beobachtete mit dem QTL 10 korrelierende Phänotyp ist, wie die Pflanzen selbst, unter Stickstoffmangel schwächer ausgeprägt, aber bei beiden Bedingungen konstitutiv vorhanden.

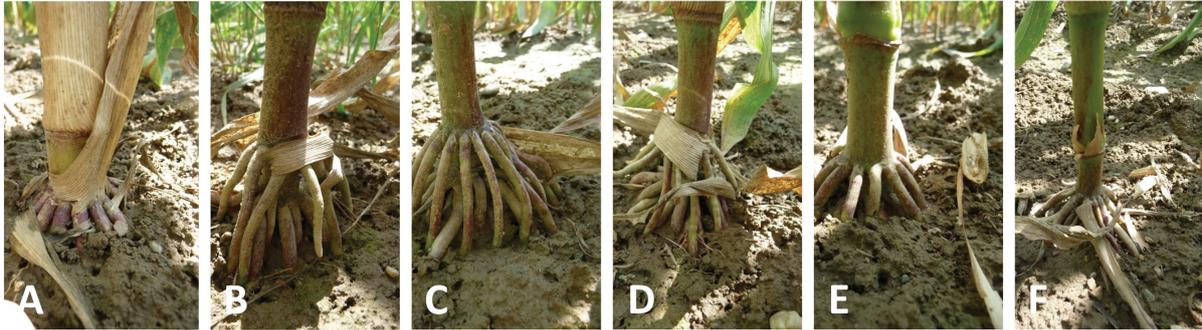


Abbildung 21. Die Kron- und Stützwurzelarchitektur verschiedener Genotypen unter niedrigen Stickstoffbedingungen

Die Abbildung zeigt die oberirdisch sichtbaren Wurzeln verschiedener Maislinien-Genotypen auf dem Versuchsfeld in Grucking bei Nitratmangelbedingungen. Abgebildet sind die Eltern SL (A) und TH (B), die Linien mit dem Chromosomenstück vom Chromosom 8 von SL, SL-N8-3HX (C) und SL-N8-40X (D), sowie die schon zuvor gezeigten Linien SL-N10-1 (E) und SL-N10-2 (F). SL-N10-1 (E) und SL-N10-2 (F) gleichen mehr dem Elter SL (A), SL-N8-3HX (C) und SL-N8-40X (D) hingegen dem Elter TH (B).

6.2.3 Die phänotypischen Unterschiede in der Kron- und Stützwurzelarchitektur sind im heterozygoten Zustand schwerer erkennbar

Die Testung der Linien auf Ertragsunterschiede im Feldversuch erfolgte beim Projektpartner KWS SAAT SE im Regelfall durch Kreuzungen mit einer sogenannten Testerlinie. Die daraus entstandenen Testkreuzungen haben den Vorteil, dass sie durch den Heterosis-Effekt deutlich vitaler sind (Brieger, 1950). Durch diese Vorgehensweise werden negative Effekte durch die Inzucht selbst weitestgehend relativiert. Es sollte die Frage geklärt werden, ob der für den QTL-Bereich auf Chromosom 10 auch der bei den Linien gefundene Phänotyp auch im heterozygoten Zustand detektierbar ist. Hierzu wurden zunächst die Testkreuzungen mit den beiden Elternlinien TH und SL begutachtet. Die Abbildung 22 zeigt die Ergebnisse für das Jahr 2010 und für den Standort Bernburg (Sachsen-Anhalt). Der Effekt vom QTL 10 konnte bei den Testkreuzungen zwar noch gefunden werden, war aber deutlich schwächer ausgeprägt als bei den ursprünglichen Linien selbst. Dies lag an einer deutlich schwächeren Ausprägung der zuvor für den Elter TH festgestellten Merkmale. Die Wurzeln der Hybriden aus TH und der Testerlinie zeigten deutlich weniger steile Wurzeln als die reine TH-Linie. Dadurch waren diese Pflanzen optisch deutlich schwerer von der Linie SL zu unterscheiden.



Abbildung 22. Kron- und Stützwurzelarchitektur von Testkreuzungen der Elternlinien am Standort Bernburg. Der bei den Elternlinien SL und TH gefundene Phänotyp zeigt sich auch bei den Hybriden aus einer Testerlinie mit SL (A) und TH (B), allerdings nicht so intensiv ausgeprägt. Alle Pflanzen zeigen nicht so extrem steile Winkel wie TH als genetisch reine Linie.

Diese Beobachtung galt verstärkt auch für die Testkreuzungen mit dem aus den Elternlinien entwickelten NILs, welche nur die QTL-Regionen der Chromosomen 8 und 10 besaßen. Die Versuchspflanzen zeigten tendenziell den jeweiligen Wurzelphänotyp, dieser war aber nicht bei allen Exemplaren so eindeutig zu sehen, wie in Abbildung 23 gezeigt. In den Wiederholungen auf dem Versuchsfeld in Bernburg war der Phänotyp bei den Testkreuzungen nur schwer zu beobachten. Im Jahr 2010 war die Tendenz zur Ausbildung von Stützwurzeln am Standort Grucking bei allen Linien ausgeprägter als am Standort Bernburg.

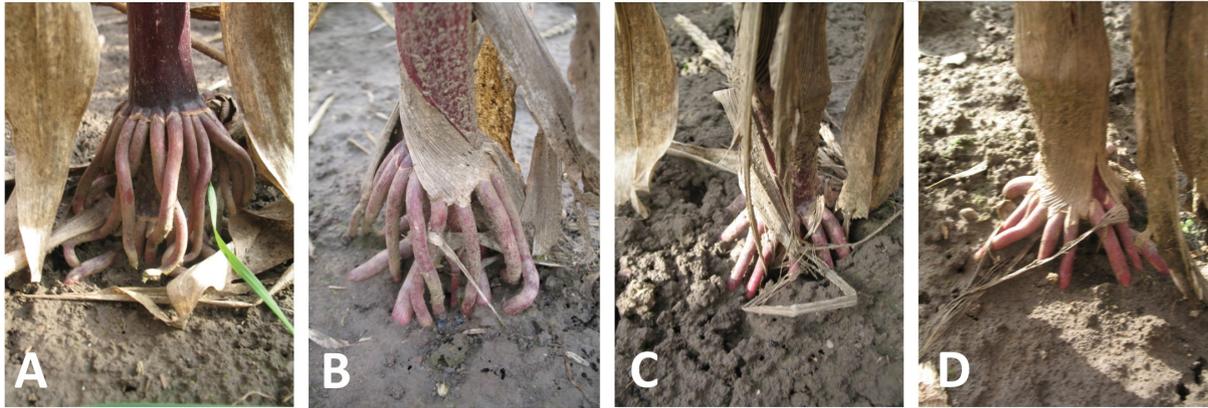


Abbildung 23. Sichtbare Wurzeln von Testkreuzungen diverser Maislinien.

Die Abbildung zeigt die Stütz- und Kronwurzeln verschiedener Testkreuzungen von NILs, die unterschiedliche QTL-Introgressionen enthalten. Die Testkreuzungen der Linien SL-N8-3HX (A) und SL-N8-40X (B) enthalten jeweils eine Introgression des QTL-Bereiches des Chromosoms 8 und ähneln dem Wurzelphänotyp von TH. SL-N10-1 (C) und SL-N10-2 (D) entsprechen Linien, welche die QTL-Region 10 in sich tragen. Ihr Wurzelverhalten ist dem des Donorelterers SL ähnlicher. Der Phänotyp zeigt sich bei den Testkreuzungen mit den Linien, welche nur einzelne Chromosomenregionen der Linie SL besitzen, deutlich schwächer. Die gezeigten Pflanzen befanden sich 2010 am Standort Bernburg.

6.2.4 Verifizierung des Kron- und Stützwurzelphänotyps und Grobkartierung der Kronwurzelwinkel unter Gewächshausbedingungen

Um den auf dem Feld gefundenen Phänotyp für den QTL auf Chromosom 10 zu verifizieren, wurden Pflanzen wie unter Kapitel 5.5.3 beschrieben im etablierten Sandsystem aufgezogen. Da die Unterschiede bezüglich der Wurzelwinkel aufgrund der in 6.2.2 gemachten Beobachtungen unabhängig von der Nitratzufuhr sind, wurden die Pflanzen mit einer Nährstofflösung von 0,075 mM Nitrat versorgt. Die Anzucht erfolgte wie in Abbildung 13 gezeigt. Es wurden zunächst NILs verwendet, von denen bekannt war, dass sie jeweils die vollständige QTL-Region vom Chromosom 8 und 10 aus SL besaßen (alte QTL-Berechnung, siehe Kapitel 4.7.2). Es wurden neben den Eltern SL und TH, die NILs SL-N10-1, SL-N10-2, SL-N8-30X und SL-N8-32X analysiert (siehe Tabelle 1). Die Genotypen für den QTL 10 sind der Abbildung 24 zu entnehmen. Je Linie wurden jeweils 20 Körner pro Experiment ausgelegt. Die Messung der Winkel der ersten vier Kronwurzeln erfolgte wie unter 5.3.5 beschrieben. Es wurden zwei biologisch unabhängige Experimente zwei Tage zeitlich versetzt durchgeführt. Das Experiment

wurde mit unterschiedlichen Saatgutchargen wiederholt, so dass insgesamt vier unabhängige Experimente durchgeführt wurden.

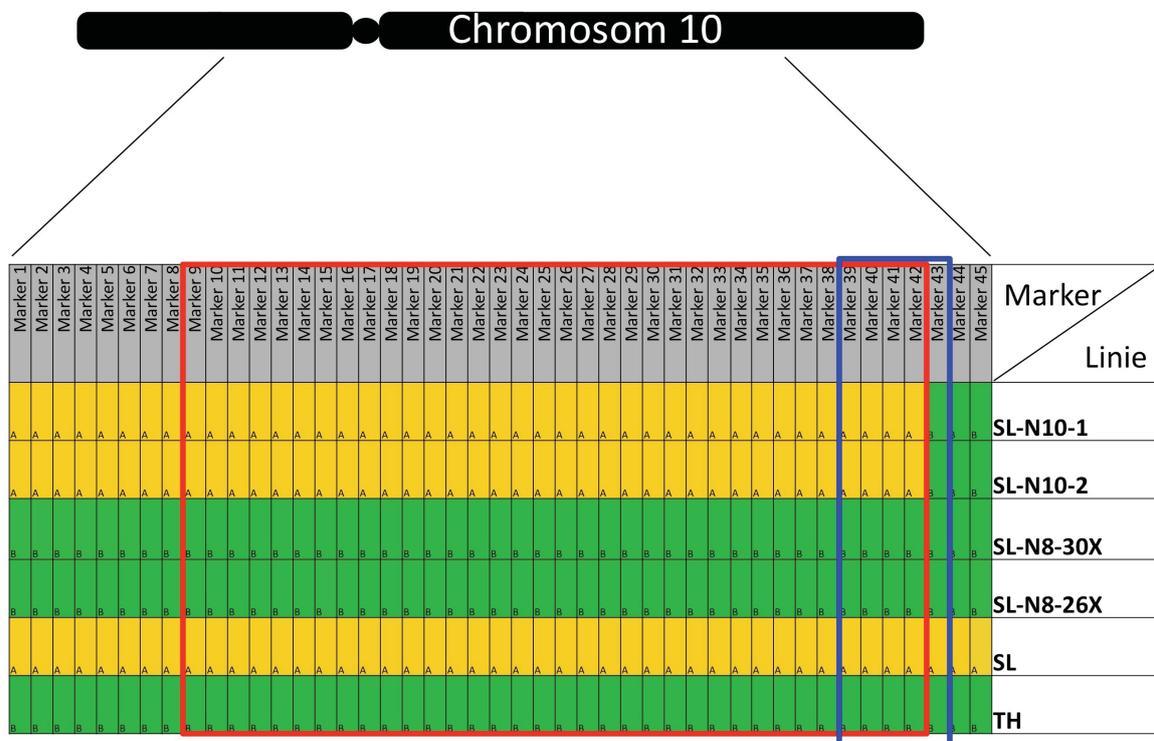


Abbildung 24 Genotypen der Linien der Grobkartierung des Stütz- und Kronwurzelpheotyps.

In der Abbildung werden die Markerergebnisse der Genotypisierung im Bereich der QTL-Region 10 und schematisch deren Lage auf dem Chromosom 10 gezeigt. Die Markerdaten wurden von der KWS SAAT SE gestellt. Die mit "A" markierten Marker (gelb) geben die SL-Allele an, die mit "B" markierten Marker (grün) die TH-Allele. Der rot markierte Bereich gibt die berechnete Lage vom alten Ertrags-QTL 10 an. Der blau markierte Bereich gibt den neu berechneten Ertrags-QTL 10 an und wird nur von der Linie SL vollständig abgedeckt. Die Introgression der Linien SL-N10-1 und SL-N10-2 decken nur den alten Ertrags-QTL 10 vollständig ab.

Die Abbildung 25 fasst die Ergebnisse der ersten beiden Experimente zusammen. Die Linien SL-N10-1 und SL-N10-2 zeigten deutlich flachere Winkel, ähnlich wie die Elternlinie SL. Dagegen verhielten sich die NILs SL-N8-30X und SL-N8-32 wie der Elter TH.

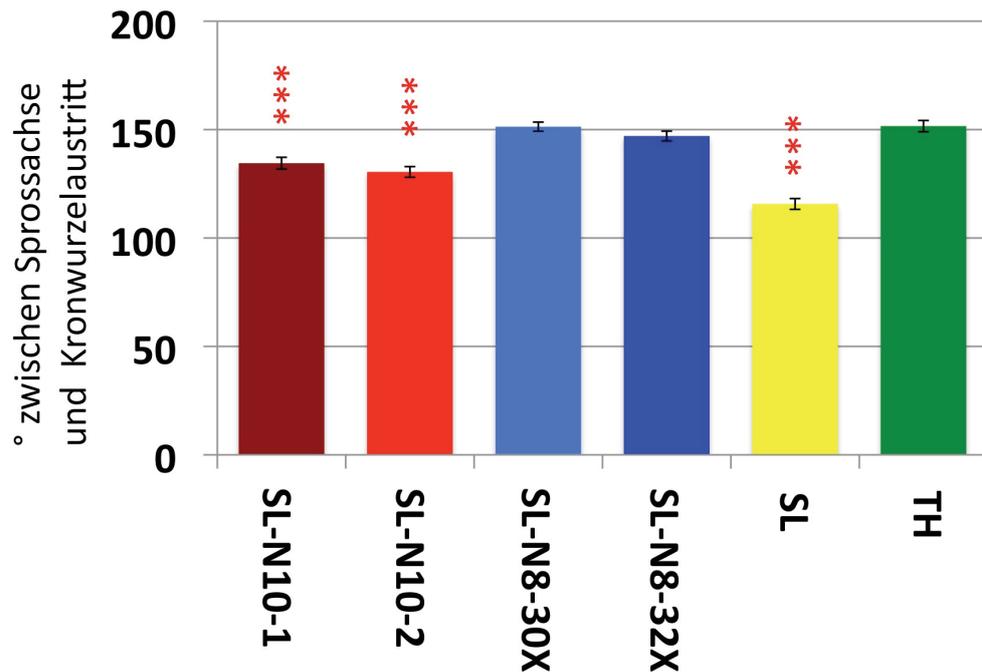


Abbildung 25. Wurzelwinkel der Elternlinien und NILs in Sandkultur: Experimente 1 und 2.

Dargestellt sind die Mittelwerte der gemessenen Wurzelwinkel der analysierten Elternlinien (SL und TH) und NILs (SL-N10-1, SL-N10-2, SL-N8-30X und SL-N8-32X). SL-N10-1 und SL-N10-2 (rot gefärbt) tragen den QTL von Chromosom 10 von SL im TH-Hintergrund, SL-N8-30X und SL-N8-32X (blau gefärbt) dagegen den QTL 8. Die Pflanzen wurden für drei Wochen bei Stickstoffmangel kultiviert. Pro Linie wurden 79–99 Wurzelwinkel der ersten vier Kronwurzeln bestimmt. Der Fehlerbalken gibt den Standardfehler an. Die roten Sterne geben die signifikant niedrigeren Werte gegenüber der Linie TH wieder. Es wurden die Mittelwerte der ersten beiden Anzuchten zusammengefasst. 0,1% = ***

In der Abbildung 26 sind die Ergebnisse der beiden Experimente mit einer weiteren Saatgutcharge dargestellt. Die Elternlinie SL zeigte hochsignifikant flachere Winkel gegen über der Linie TH. SL-N10-1 wies ebenfalls eine leichte Signifikanz bezüglich flacherer Kronwurzelwinkel auf. SL-N8-30X besaß hingegen signifikant steilere Wurzeln als TH.

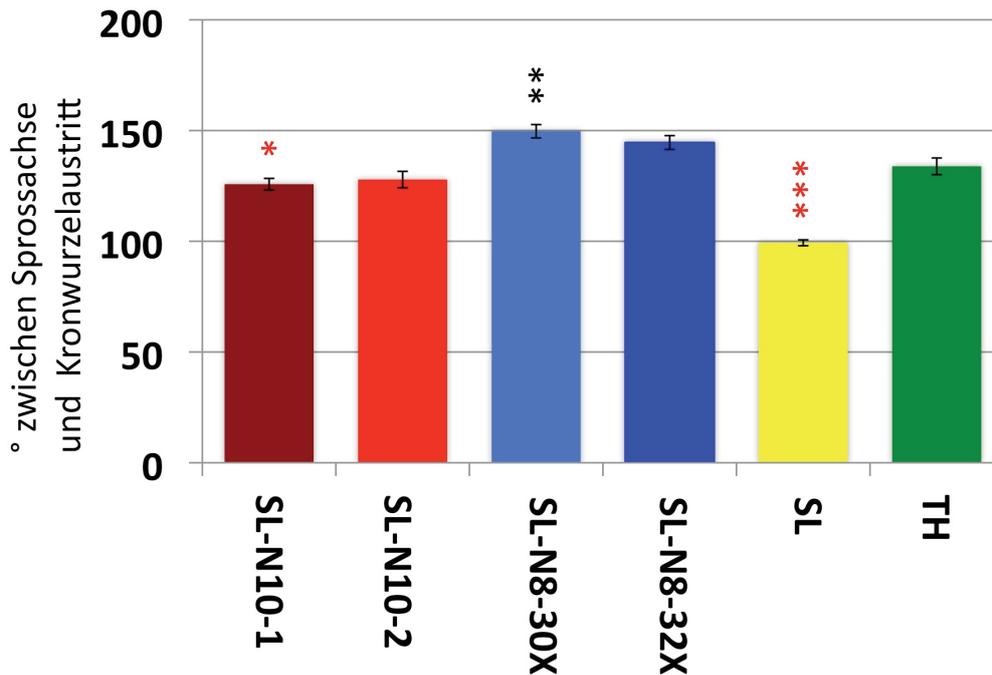


Abbildung 26. Wurzelwinkel der Elternlinien und NILs in Sandkultur: Experiment 3 und 4.

Dargestellt sind die Mittelwerte der gemessenen Wurzelwinkel der analysierten Elternlinien (SL und TH) und NILs (SL-N10-1, SL-N10-2, SL-N8-30X und SL-N8-32X). SL-N10-1 und SL-N10-2 (rot gefärbt) tragen den QTL von Chromosom 10 von SL im TH-Hintergrund, SL-N8-30X und SL-N8-32X (blau gefärbt) dagegen den QTL 8. Die Pflanzen wurden für drei Wochen bei Stickstoffmangel kultiviert. Pro Linie wurden 39–79 Wurzelwinkel der ersten vier Kronwurzeln bestimmt. Der Fehlerbalken gibt den Standardfehler an. Die schwarzen Sterne geben die signifikant höheren Werte gegenüber TH an. Die roten Sterne geben die signifikant niedrigeren Werte gegenüber der TH wieder. Es wurden die Mittelwerte der dritten und vierten Anzucht zusammengefasst. 0,1% = ***; 1% = **; 5% = *

Bei der dritten und vierten Wiederholung des Experiments keimte die neue Saatgutcharge von TH deutlich schlechter. Deshalb standen insgesamt nur 10 statt geplanter 20 TH-Pflanzen für die Phänotypisierung der Wurzelwinkel zur Verfügung.

Zusammenfassend für alle Experimente konnte bei der Anzuchtmethode in Sand beobachtet werden, dass die Eltern auch hier Unterschiede bezüglich der Austrittswinkel der Kronwurzeln zeigten: SL wies deutlich flachere Austrittswinkel auf als TH. Die Ergebnisse der auf dem Versuchsfeld gemachten Beobachtungen (siehe 6.2.1) konnten bestätigt und unter kontrollierten Bedingungen reproduziert werden. Auch bei den analysierten nahe-isogenen Linien wurde die Tendenz zu flacheren Austrittswinkeln bei denen, welche den QTL des Chromosoms 10 von SL trugen, bestätigt. Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass der QTL 8 nicht für flachere Wurzelaustrittswinkel verantwortlich ist.

6.2.5 Feinkartierung der Kronwurzelwinkel auf Chromosom 10

Für NILs mit dem gesamten alten QTL-Bereich vom Chromosom 10 von SL konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen dieser Genregion und dem Grad der Austrittswinkel der ersten vier Kronwurzeln gezeigt werden. Im Folgenden wurde versucht, den Bereich des QTLs zu begrenzen, welcher für den beobachteten Phänotyp verantwortlich ist. Hierzu wurden in Zusammenarbeit mit der KWS SAAT SE Linien entwickelt, die kürzere Bereiche der alten QTL-Region enthielten. Diese SubNILs wurden identisch wie die Elterlinien (Kapitel 6.2.4) angezogen. Pro Experiment und Linie wurden 20 Korn ausgelegt. Eine Übersicht der verwendeten Saatgutchargen findet sich in Tabelle 1. Die im Experiment verwendeten Genotypen zeigt die Abbildung 27. Dort sind die Ergebnisse der Genotypisierung für den QTL-Bereich 10 aller phänotypisierten Linien der Experimente 1 und 2 dargestellt. Die Linie SL-N8-26X trägt ihre Introgression im Bereich des QTLs 8, weshalb sie an diesem Locus mit TH identisch ist. Die beiden aus der NIL SL-N10-2 entwickelten SubNILs decken den Bereich der Mutterlinie ab, überlappen aber nicht. Die SubNIL-C beinhaltet neben Linien SL-N10-1 und SL-N10-2 den vollständigen alten QTL 10, weshalb sie ebenfalls flachere Kronwurzelwinkel zeigen sollte. Den neuen QTL beinhaltet in den gezeigten Experimenten der Feinkartierung nur der Elter SL vollständig (Abbildung 27).

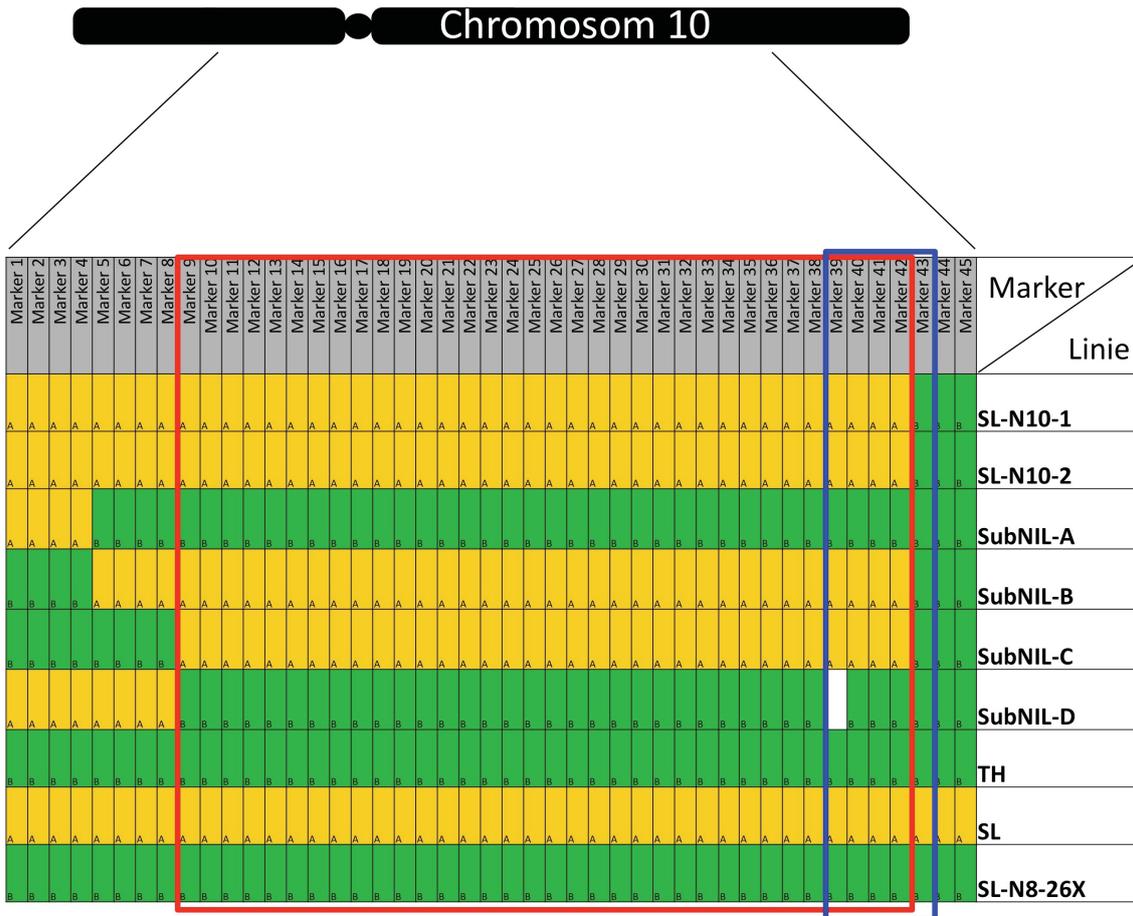


Abbildung 27. Übersicht über die Genotypen für die Feinkartierungsexperimente 1, 2, 3 und 4.

In der Abbildung werden die Markerergebnisse der Genotypisierung im Bereich der QTL-Region 10 gezeigt. Die Markerdaten wurden von der KWS SAAT SE gestellt. Die mit "A" markierten Marker (gelb) geben die SL-Allele an, die mit "B" markierten Marker (grün) die TH-Allele. Es sind die Introgressionen der NILs SL-N10-1 und SL-N10-2 zu sehen. Die NIL SL-N8-26X besitzt im dargestellten Chromosomenbereich keine Introgression. Die SubNILs C und D wurden aus SL-N10-2 entwickelt und decken deren Introgressionsbereich ab. Beide SubNILs überschneiden sich aber nicht, sondern treffen an einem der äußeren Ränder des alten Ertrags-QTLs aufeinander. Die SubNILs A und B teilen die Introgression der Linien SL-N10-1 und SL-N10-2 alternativ auf. Der rot markierte Bereich gibt die berechnete Lage vom alten Ertrags-QTL 10 an und wird von SubNIL-C repräsentiert. Der blau markierte Bereich gibt den neu berechneten Ertrags-QTL 10 an und wird nur von der Linie SL vollständig abgedeckt.

Es wurden zwei biologisch unabhängige Experimente mit zwei Tagen Versatz durchgeführt. Die Ergebnisse wurden zusammengefasst und sind in der Abbildung 28 dargestellt. Je Linie wurden insgesamt 123–159 Kronwurzeln ausgewertet. SL und die Linien SL-N10-1 und SL-N10-2 zeigten wieder hochsignifikant flachere Wurzelaustrittswinkel bei den ersten vier Kronwurzeln als TH. Damit wurden die Ergebnisse aus 6.2.4 bestätigt. Auch die aus SL-N10-2 durch Rückkreuzung mit dem Elter TH entwickelten Linien SubNIL-C und SubNIL-D wiesen hochsignifikant flachere

Winkel auf, obwohl sie unterschiedliche Bereiche der QTL 10-Region repräsentieren. Allerdings waren die Werte der SubNIL-D deutlich höher und damit die Winkel weniger flach. Eine Betrachtung der Ergebnisse separiert nach den Einzelerperimenten zeigt für diese Linie eine schwächere statistische Signifikanz gegenüber dem Elter TH (Daten nicht gezeigt). Die SubNIL-C deckte die berechnete Lage vom alten QTL 10 ab und zeigte hoch signifikant flachere Winkel als der Elter TH.

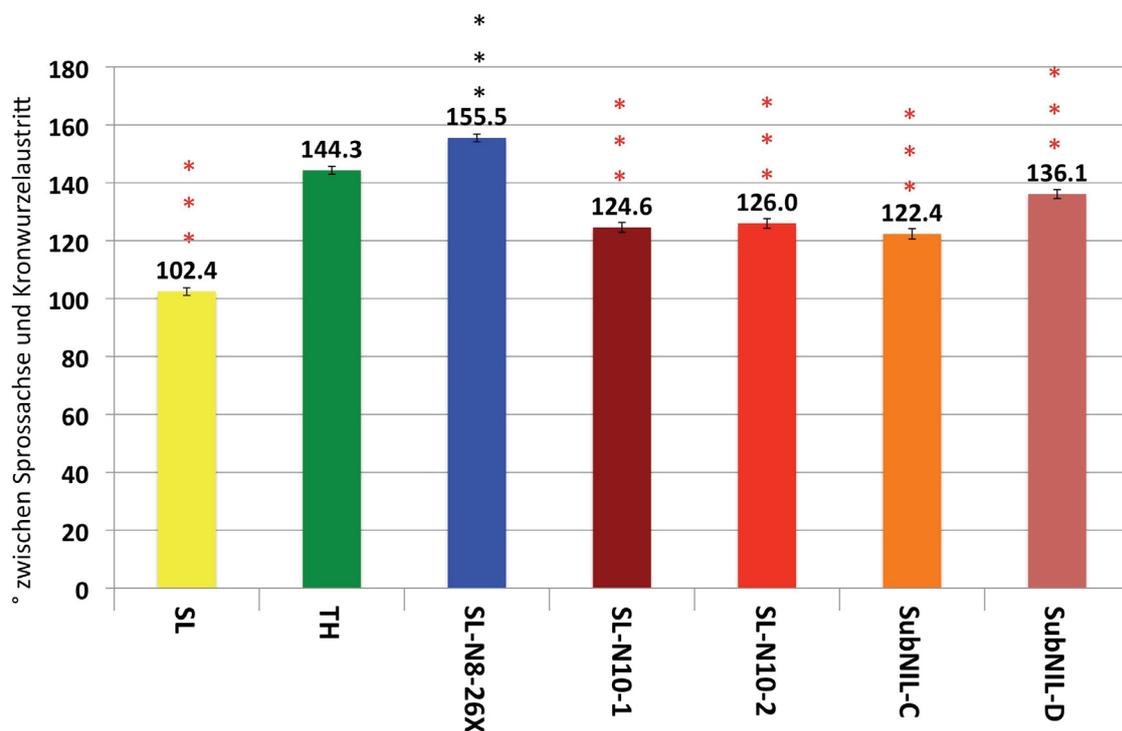


Abbildung 28. Feinkartierung der Kronwurzelwinkel: Zusammenfassung der Werte von Experiment 1 und 2. In der Abbildung sind in einem Säulendiagramm die Mittelwerte der gemessenen Wurzelwinkel in Grad der analysierten Eltern (SL und TH), NILs (SL-N8-26X, N10-1 und SL-N10-2) und SubNILs (C und D) dargestellt. Die Eltern SL und TH unterscheiden sich deutlich, ebenso die NILs N8 und N10 mit den QTL-Introgressionen auf dem Chromosom 8 und 10. Die Linie mit der Introgression auf Chromosom 8 (blau) zeigt deutlich steilere Wurzeln und Linien mit der Introgression von Chromosom 10 (Rottöne) flachere Winkel als TH. Die beiden SubNILs C und D der Linie SL-N10-2 zeigten ebenfalls flachere Kronwurzelwinkel. Pro Linie wurden 123–159 Wurzelwinkel der ersten vier Kronwurzeln bestimmt. Der Fehlerbalken gibt den Standardfehler an. Die schwarzen Sterne geben die signifikant höheren Werte gegenüber der Linie TH an. Die roten Sterne geben die signifikant niedrigeren Werte gegenüber der Linie TH wieder. Es wurden die Mittelwerte der beiden um 2 Tage versetzten Experimente zusammengefasst. 0,1% = ***.

Erwartet wurde, dass nur die SubNIL-C flache Wurzelaustrittswinkel zeigen würde. Allerdings zeigten beide aus der Linie SL-N10-2 entwickelten SubNILs, entgegen der Erwartungshaltung, flachere Wurzelwinkel. Zur weiteren Verifizierung der für die

flacheren Wurzelwinkel verantwortlichen Genregion innerhalb des QTLs 10 wurden weitere Experimente durchgeführt, die in der Abbildung 28 gezeigten Genotypen erneut überprüft und zusätzlich zwei SubNILs analysiert, welche unabhängig aus der Linie SL-N10-1 entwickelt worden waren. Dies sollte sicherstellen, dass der beobachtete Effekt nicht durch geringe SL-Verunreinigungen auf anderen Chromosomenregionen zurückzuführen war. Die in den Experimenten verwendeten Genotypen sind in der Abbildung 27 gezeigt. Die Genotypen wurden bewusst so gewählt, dass die zusätzlich analysierten Linien den Bereich außerhalb des alten QTL-Bereiches der Introgression und dem QTL-Bereich selbst distinkter zerteilen. Die ersten ausgewerteten SubNILs besitzen den Bruchpunkt der Introgressionen direkt am Rand des alten QTLs 10, was erklären kann warum beide SubNILs flachere Wurzelwinkel zeigen. Die Analyse der Wurzelaustrittswinkel der Kronwurzeln der SubNIL-A und SubNIL-B sollte diese Frage beantworten. Des Weiteren sollte die Auswahl dieser dazu dienen, sicher beantworten zu können, ob der beobachtete Phänotyp vom alten QTL-Bereich des Chromosoms 10 oder vielleicht auch durch weitere Teile der SL-Introgression der Linien SL-N10-1 oder SL-N10-2 bedingt ist.

Die Ergebnisse der Analyse der Kronwurzelwinkel der in Abbildung 27 gezeigten Genotypen sind in der Abbildung 29 dargestellt. Die Experimente 3 und 4 bestätigten die Ergebnisse der Grobkartierung der Eltern und NILs genauso wie die Ergebnisse für die SubNILs C und D aus dem Experimenten 1 und 2 der Feinkartierungen. Beide SubNILs der NIL SL-N10-2 zeigten erneut signifikant flachere Wurzeln als die Linie TH. Bei den SubNILs A und B wird nach den Daten der Genotypisierung gleichfalls der ganze Bereich der Introgression der NILs SL-N10-1 und SL-N10-2 abgedeckt. Der alte QTL 10 ist bei der SubNIL-A gegenüber der SubNIL-D deutlich weiter ausgespart. Die SubNIL-A besitzt nur eine SL-Introgression außerhalb des QTL 10-Bereiches und zeigte als einzige getestete SubNIL Kronwurzelwinkel ähnlich wie der rekurrente Elter TH. Der durchgeführte t-Test zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Stichproben an und die absoluten Mittelwerte der Kronwurzelwinkel unterschieden sich nur um $1,2^\circ$. Damit beweist SubNIL-A, dass der chromosomale Bereich vom alten QTL 10 für den flacheren Kronwurzelphänotyp von SL verantwortlich ist und die Introgression von SubNIL-A keinen genetischen Einfluss mehr auf die Gradzahl von Austrittswinkeln der Kronwurzel besitzt. Alle weiteren analysierten SubNILs, zeigten signifikant flachere Wurzelwinkel als der rekurrente Elter TH. Die analysierten SubNILs verhielten sich wie

die NILs SL-10-1 und SL-10-2, was wiederum bestätigt, dass der alte QTL 10 für den Phänotyp der flachen Austrittswinkel der Kronwurzeln von SL genetisch verantwortlich ist. Der Neuberechnete QTL 10 war auch in den Experimenten 3 und 4 der Feinkartierung nur beim Elter SL vollständig enthalten.

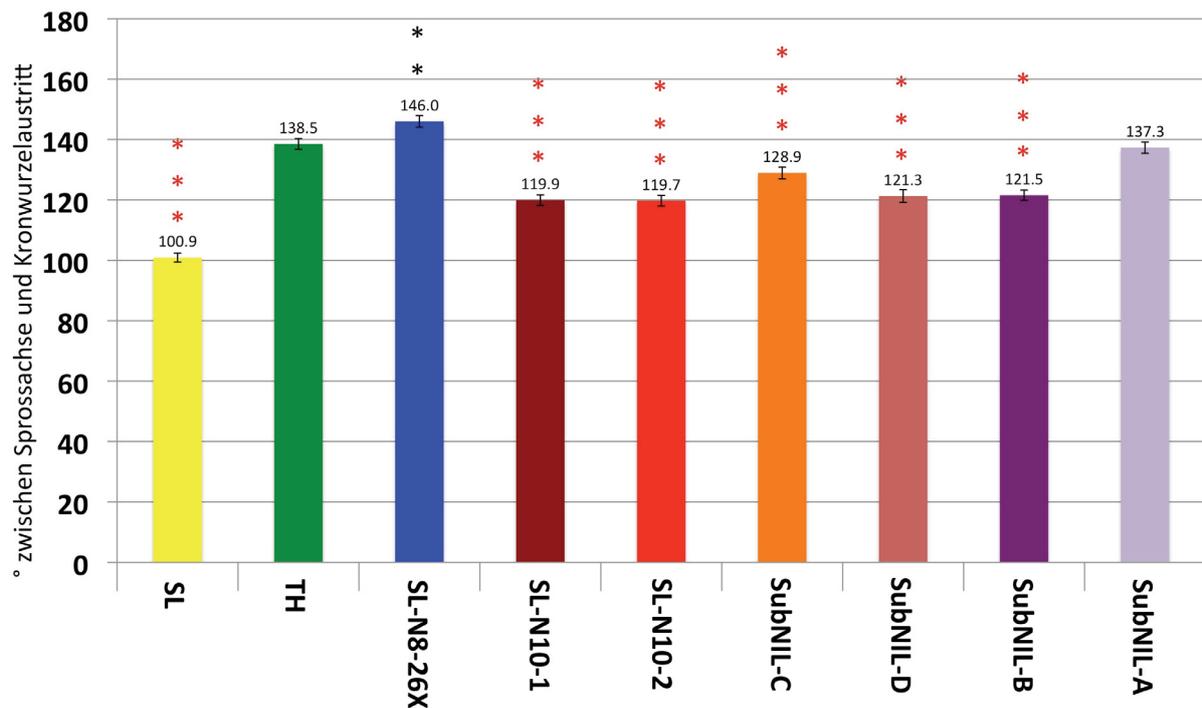


Abbildung 29. Feinkartierung der Kronwurzelwinkel: Zusammenfassung der Werte von Experiment 3 und 4. Dargestellt sind die Mittelwerte der gemessenen Wurzelwinkel der analysierten Eltern (SL und TH), NILs (SL-N8-26X, SL-N10-1 und SL-N10-2) und SubNILs (A, B, C und D) dargestellt. Die Eltern SL und TH, sowie die NILs N8 und N10 mit den QTL-Introgressionen auf dem Chromosom 8 oder 10 unterscheiden sich deutlich hinsichtlich ihrer Kronwurzelwinkel. Die NIL SL-N8-26x mit der Introgression auf Chromosom 8 (blau), zeigt sogar deutlich steilere Wurzeln als TH. SL-N10-1 und SL-N10-2 mit der Introgression von Chromosom 10 zeigen flachere Winkel als TH. Die beiden SubNILs der Linie SL-N10-2 (SubNIL-C und SubNIL-D) zeigen ebenfalls flachere Kronwurzelwinkel. Die SubNILs der Linie SL-N10-1 (SubNIL-A und SubNIL-B) verhalten sich dagegen unterschiedlich. Pro Linie wurden 111–143 Winkel der ersten vier Kronwurzeln bestimmt. Der Fehlerbalken gibt den Standardfehler an. Die schwarzen Sterne geben die signifikant höheren Werte gegenüber der Linie TH an. Die roten Sterne geben die signifikant niedrigeren Werte gegenüber der Linie TH wieder. Es wurden die Mittelwerte der beiden um 2 Tage versetzten Experimente zusammengefasst. 0,1% = ***; 1% = **

Aufgrund der Ergebnisse der Experimente 1 bis 4 zur Feinkartierung der Kronwurzelwinkel kann zusammenfassend gesagt werden, dass die genetische Kontrolle in der alten QTL 10-Region der Linie SL verankert ist. Weitere durch die

verschieden großen SL-Introgression abgedeckte Bereiche können für diesen Phänotyp ausgeschlossen werden. Die Ergebnisse führen zu dem Schluss, dass das Gen oder die Gene für die Steilheit der Austrittswinkel höchstwahrscheinlich, in der Region zwischen Marker 39 (105,87 putative Centimorgan) und Marker 42 (112,48 putative Centimorgan) liegen sollten. Alle NILs, wie auch die SubNILs mit signifikant flacheren Kronwurzelaustrittswinkeln, grenzen mit SL-Allelen an diese Region oder decken diese ab. Eine weitere mögliche Schlussfolgerung wäre die Existenz von zwei wirksamen Genen an den Rändern des alten QTLs 10. So könnte neben dem zuvor genannten Genbereich in der Region zwischen Marker 8 (81,93 putative Centimorgan) und Marker 9 (82,07 putative Centimorgan) ein weiterer auf die Kronwurzelwinkel wirkender Genbereich innerhalb des alten QTLs 10 existieren. Dies würde den denkbaren Fall erklären, dass die SubNIL-D noch im entscheidenden Genbereich zwischen den Marker 8 und Marker 9 genetisch mit dem Elter SL identisch ist, die SubNIL-C aber nicht mehr. Dann könnte ein weiterer Genbereich innerhalb des alten QTLs 10 gleichfalls eine regulierende Rolle bei den Wurzelaustrittswinkeln der Kronwurzel spielen.

6.2.6 Vergleich der Ergebnisse der Feinkartierung der Kronwurzelwinkel mit der Wurzelarchitektur adulter Pflanzen unter Feldbedingungen

Die in Sandkultur im Gewächshaus bei drei Wochen alten Jungpflanzen durchgeführte Feinkartierung der phänotypisch flacheren Kronwurzelaustrittswinkel der Linie SL zeigte, dass eine bestimmte Genregion für diesen Phänotyp verantwortlich ist. Diese Beobachtung konnte auch bei denen zur Feinkartierung des Phänotyps analysierten SubNILs gemacht werden (siehe 6.2.5). Abhängig von der Lage ihrer SL-Introgression zeigten sie jeweils flachere oder steilere Wurzelwinkel. Um die Frage zu klären, ob dieser Einfluss sich nicht nur bei juvenilen Pflanzen zeigt, sondern auch beim adulten Wurzelsystem, wurden auf einem Versuchsfeld in Einbeck (Niedersachsen) bei hohen Stickstoffbedingungen Wurzelsysteme der auch in 6.2.5 untersuchten Linien der Erde entnommen (Abbildung 30). Die aus der Erde ausgegrabenen Wurzelsysteme waren sicherlich nicht vollständig. Aber TH (A) und SL (B) zeigten auch hierbei deutliche Unterschiede bezüglich der Kron- und Stützwurzelarchitektur (Abbildung 30 A und B). TH besaß ein geringer stark entwickeltes Wurzelsystem, mit Kron- und Stützwurzeln,

die deutlich senkrechter orientiert waren. Das Wurzelsystem von SL erfasste dagegen stärker den Raum und wirkte dadurch breiter und größer. Die SubNIL-A (Abbildung 30 C) zeigte wie bereits bei der Analyse der ersten vier Kronwurzeln auch im adulten Stadium eine deutlich steilere Wurzelarchitektur und glich damit mehr dem rekurrenten Elter TH. Die SubNIL-B (Abbildung 30 D) dagegen zeigte auch in der späteren Entwicklung flachere Austrittswinkel der Kronwurzeln und tendierte mehr zur Wurzelarchitektur vom Elter SL. Damit bestätigten sich die in den Kapiteln 6.2.4 und 6.2.5 gezeigten Ergebnisse, dass der QTL 10 die Gradzahl der Austrittswinkel genetisch reguliert.



Abbildung 30. Im Sandversuch feinkartierte adulte Maislinien zeigen auch auf dem Feld Unterschiede in der Architektur von Kron- und Stützwurzeln.

Abgebildet sind die Wurzelsysteme der Linien TH (A), SL (B), SubNIL-A (C) und SubNIL-B (D). Die Entnahme der Pflanzen erfolgte während des Zeitpunktes der Kornfüllung im August. Die Pflanzen wuchsen in Einbeck unter hohen Stickstoffbedingungen und die Wurzelsysteme konnten aufgrund der Bodenstruktur nicht vollständig entnommen werden. Trotzdem sind bei TH (A) und SL (B) deutliche Unterschiede bezüglich der Kron- und Stützwurzelarchitektur zuerkennen. Die SubNIL-A (C) zeigt auch im adulten Stadium eine deutlich steilere Wurzelarchitektur als die SubNIL-B (D).

6.2.7 Feinkartierung der höheren Lateralwurzeldichte der Linie SL auf dem Chromosom 8

Im Rahmen früherer Arbeiten wurde eine Korrelation zwischen erhöhtem Ertrag bei niedriger Stickstoffzufuhr und der Dichte der Lateralwurzeln auf der Primärwurzel gefunden (Kapitel 4.7). Eine erhöhte Bildung von Lateralwurzeln bei der Linie SL könnte bei gleicher Gesamtwurzellänge zu einer deutlich effektiveren Wurzelarchitektur führen. Die genaue Lage des beobachteten Phänotyps innerhalb des QTL-Bereiches auf dem Chromosom 8 war nicht bekannt. Es galt zu klären, ob die erhöhte Dichte der Lateralwurzeln im QTL 8 zu kartieren ist und der QTL-Bereich dadurch weiter eingegrenzt werden kann. Zur Kartierung der Lateralwurzeldichte wurden zahlreiche NILs und SubNILs zusammen mit den Projektpartner KWS SAAT SE entwickelt, welche Introgressionen der Linie SL auf dem Chromosom 8 und TH als rekurrenten Elter besaßen.

Verschiedene NILs sowie die Eltern TH und SL wurden für die Feinkartierung der Lateralwurzeldichte in Keimrollen wie in den Kapiteln 5.3.3 und 5.5 beschrieben angezogen und phänotypisiert. Für die Elternlinien konnte unter niedriger Stickstoffzufuhr eine erhöhte Lateralwurzelbildung bei SL festgestellt werden (siehe auch 6.2.8) Die Daten (Daten nicht gezeigt) der analysierten NILs waren widersprüchlich und es wurde zunächst davon ausgegangen dass dies an starken Saatguteffekten lag. Im Nachhinein zeigte sich, dass die untersuchten NILs den neu berechneten QTL 8 nur teilweise oder gar nicht enthielten. Eine klare Aussage, ob eine und wenn ja welche Genregion auf dem Chromosom 8 für den für erhöhtes Lateralwurzelwachstum sorgt konnte deshalb nicht gemacht werden.

6.2.8 Vergleich der Lateralwurzelentwicklung der Elternlinien SL und TH in Sandkultur

Die im Kapitel 5.5.3 beschriebene etablierte Kultur von Pflanzen in Sand als Substrat eröffnete die Möglichkeit, wesentlich weiter entwickelte Wurzelsysteme, welche unter möglichst feldnahen Bedingungen heranwachsen zu analysieren. Dieses spätere

Entwicklungsstadium der Pflanzen sorgte für eine größere Unabhängigkeit vom Korn. Es wurden Primärwurzeln von Pflanzen geerntet welche nach einer Woche ohne Nährstoffe zwei Wochen bei niedriger Stickstoffzufuhr gewachsen waren. Die Abbildung 31 zeigt typische separierte Primärwurzeln für Pflanzen dieses Alters bei den beschriebenen Bedingungen. Man erkennt deutlich, dass die drei Primärwurzeln von TH wesentlich weniger Lateralwurzeln besaßen und auch kürzere Lateralwurzeln aufwiesen. Bei SL dagegen dominierten verhältnismäßig die Lateralwurzeln die axiale Hauptwurzel.

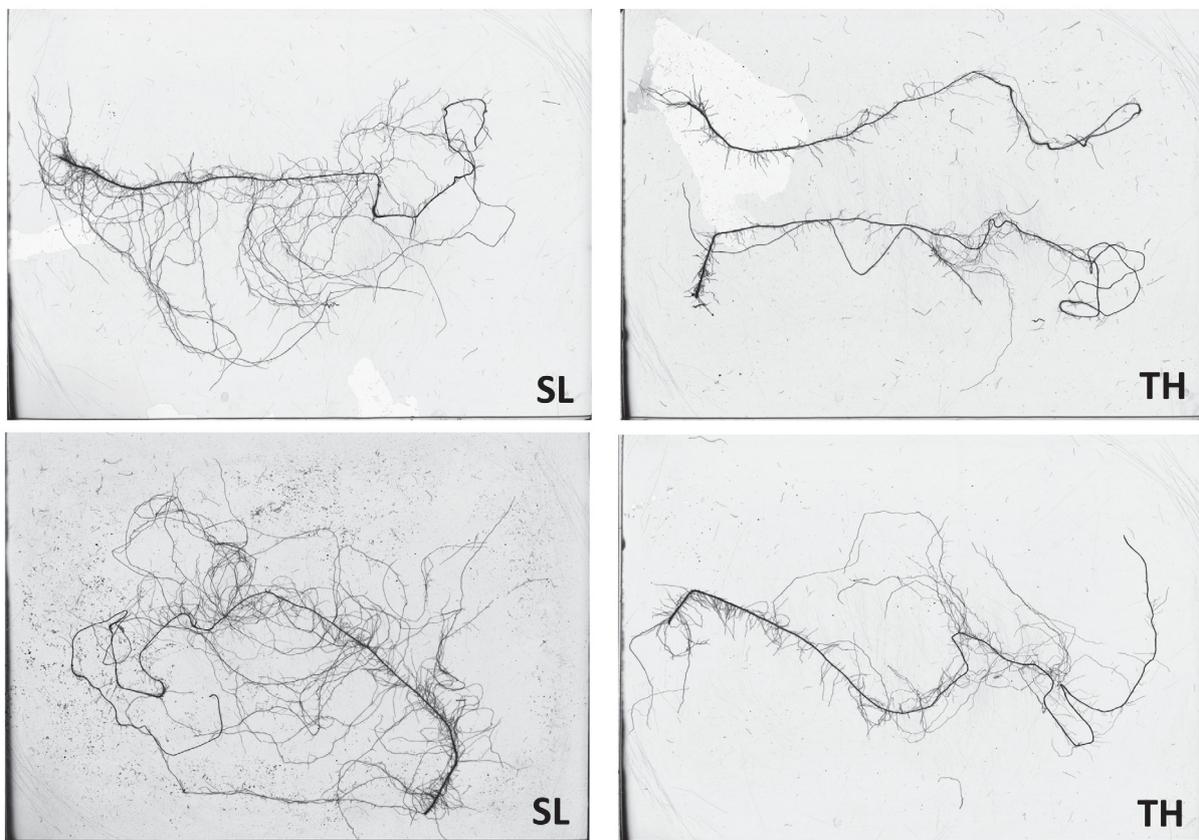


Abbildung 31. Primärwurzeln drei Wochen alter Pflanzen gewachsen bei niedriger Stickstoffzufuhr schwimmend im Wasser abgebildet.

Die vier Bilder zeigen abgetrennte drei Wochen alte Primärwurzeln der beiden Elternlinien, welche bei niedriger Stickstoffzufuhr aufgezogen wurden. Beide linke Bilder zeigen jeweils eine Primärwurzel von SL. Die beiden rechten Bilder zeigen insgesamt drei Primärwurzeln der Linie TH. Die Wurzeln wurden schwimmend im Wasser abgebildet. Die Unterschiede in der Lateralwurzelausbildung sind ausgeprägt.

Diese Primärwurzeln wurden wie unter 5.3.3 beschrieben mit WhinRhizo™ analysiert. Es wurde die Gesamtlänge (Abbildung 32 C) der Primärwurzeln bestimmt. Zusätzlich

wurden auch die Gesamtlängen der einzelnen Bestandteile der Primärwurzel: Lateralwurzeln (Abbildung 32 A) und die axiale Primärwurzel (Abbildung 32 B). SL zeigte eine hochsignifikant höhere Gesamtlänge der Lateralwurzeln und wies einen ca. 50 % höheren Wert als die Linie TH auf. Auch bei der Länge der axialen Primärwurzel kam SL im Durchschnitt auf signifikant größere Wurzeln. Der bezüglich der Gesamtlänge der Primärwurzel ebenfalls hochsignifikante Unterschied zwischen SL und TH war also in der Länge der Lateralwurzeln begründet. Die Ergebnisse bestätigten die Daten, dass SL unter niedrigen Stickstoffbedingungen bei seiner Primärwurzel deutlich längere und mehr Lateralwurzeln als der Elter TH machte (siehe 6.3.1 und Daten Elena Pestsova, unveröffentlicht).

Auch NILs mit Introgressionen des QTLs 8 wurden mit diesem System analysiert (Daten nicht gezeigt), es konnten aber auch hier bei diesem späteren Zeitpunkt bei keiner der NILs konstante Ergebnisse erzielt werden.

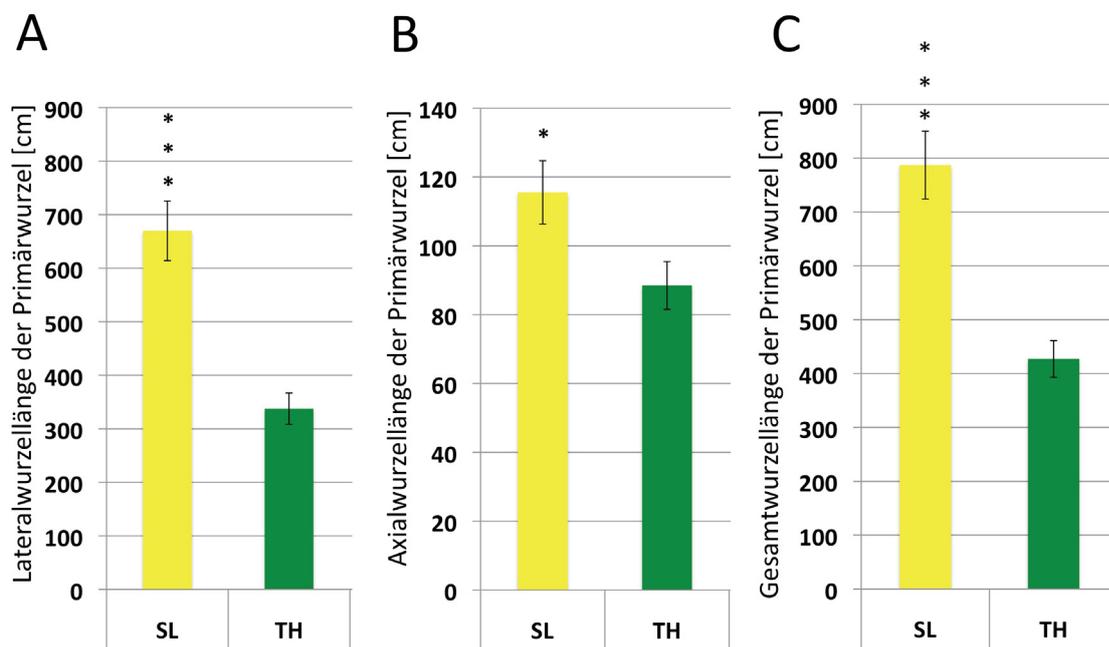


Abbildung 32. Bestimmung der Primärwurzellänge insgesamt und separat für Lateralwurzeln bzw. axiale Primärwurzel.

Die drei Graphen (A, B, und C) geben die bestimmten Wurzellängen der Primärwurzel der drei Wochen alten Pflanzen wieder, welche bei niedriger Stickstoffzufuhr wuchsen. A zeigt die Länge aller Lateralwurzeln. B gibt die Länge der axialen Primärwurzel wieder. C zeigt die Gesamtlänge der Primärwurzel. In allen drei Kategorien zeigt SL signifikant höhere Werte und damit längere Wurzeln. Der Fehlerbalken gibt den Standardfehler an. Die schwarzen Sterne geben die signifikant höheren Werte gegenüber dem rekurrenten Elter TH an. Je Linie wurden 24–31 Primärwurzeln mit WinRhizo™ analysiert. 0,1% = ***, 5% = *

6.3 Physiologische und molekularbiologische Untersuchungen der Reaktion von SL und TH auf Nitrat

6.3.1 Quantifizierung der Reaktion der Elternlinien auf verschieden hohe Nitratkonzentrationen anhand der Primärwurzelentwicklung

Die Elternlinien SL und TH zeigten schon im Sämlingsalter große Unterschiede hinsichtlich der Ausbildung von Lateralwurzeln bei niedriger Stickstoffzufuhr. Die Primärwurzeln von SL zeigten beständig mehr und längere Lateralwurzeln gegenüber denen von TH (Abbildung 33). Es galt zu untersuchen, ob die Entwicklung der Lateralwurzeln durch Nitrat beeinflusst wird und wie die Reaktion auf höhere bzw. niedrigere Konzentrationen ist. Die Versuche wurden mit den unter 5.5.2.1 beschriebenen drei Nährstofflösungen mit unterschiedlich hohem Nitratgehalt nach 5.5 durchgeführt.

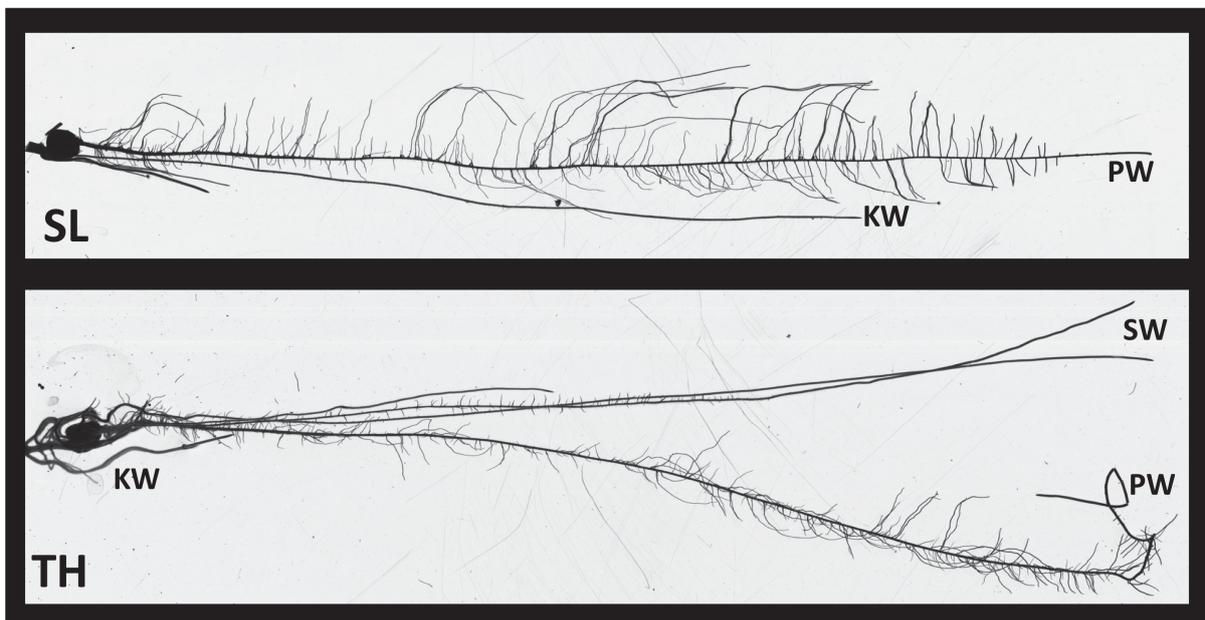


Abbildung 33. Vergleich der Wurzelarchitektur 12 Tage alter Sämlinge nach Anzucht bei niedriger Stickstoffzufuhr.

Dargestellt sind 12 Tage alte Wurzelsysteme der Linien SL und TH. Die Pflanzen wurden mit Nährlösung mit einer Konzentration von 0,1 mM Nitrat aufgezogen. Die Elternlinien SL und TH unterschieden sich unter diesen Bedingungen schon im Sämlingsstadium bezüglich ihrer Wurzelarchitektur. Besonders stark unterscheiden sich die Linien hinsichtlich der Lateralwurzelausbildung der Primärwurzel (PW). Zusätzlich bildet SL selten Seminalwurzeln (SW) aus. Die Austrittswinkel der Kronwurzeln (KW) betreffende Unterschiede waren aufgrund der Kultur in Keimrollen nicht zu erkennen.

SL und TH zeigten eine unterschiedliche Reaktion auf Nitrat im Nährmedium (siehe Abbildung 34). Es konnte eine starke Genotyp-Nitrat-Interaktion festgestellt werden. Während SL nahezu keine Reaktion auf steigende Nitratkonzentrationen im Medium zeigte, kam es bei TH zu einer stärkeren Lateralwurzelbildung, je mehr Nitrat zugeführt wurde (Pestsova, unveröffentlicht).

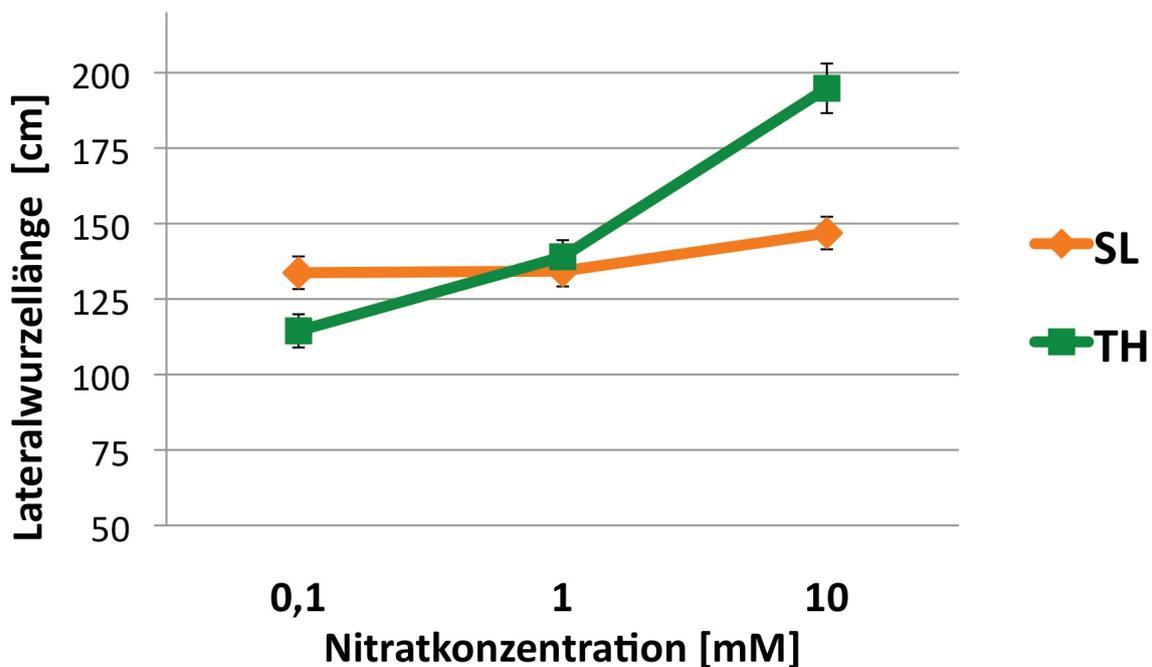


Abbildung 34. Reaktion der Lateralwurzeln auf unterschiedlich hohe Nitratkonzentrationen im Nährmedium.

Die Linien SL und TH zeigten verschiedene Reaktionen auf die äußere Nitratkonzentration im Nährmedium. SL reagierte nahezu gar nicht auf steigende Nitratkonzentrationen, nur bei sehr hohen äußeren Konzentrationen gab es eine leichte Reaktion. Die stickstoffineffiziente Linie TH zeigte dagegen eine proportionale Zunahme der Lateralwurzellänge bei steigenden Nitratkonzentrationen im Nährmedium. Die Daten sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten von 12 Tage alten Sämlingen bei Kultur in Keimrollen. Angegeben ist der Standardfehler. Je Linie und Nitratstufe wurden 40–65 Pflanzen analysiert. Abgewandelt von Pestsova (Elena Pestsova, unveröffentlicht).

6.3.2 Quantifizierung des Gesamt-Stickstoffstatus der Trockenmasse beider Eltern

Es wurde untersucht, ob sich der Unterschied in der Stickstoffnutzeffizienz der Linien SL und TH auch in einem unterschiedlichen Stickstoffstatus der jungen Maispflanzen zeigt. Hierzu wurden die Spross- und Wurzelsysteme getrennt geerntet und analysiert. Die Aufzucht und Entnahme erfolgte in Hydrokultur wie unter Kapitel 5.5.2 beschrieben. Die

Kultur erfolgte wie im Schema der Abbildung 12 gezeigt, mit dem Unterschied, dass die Entnahme des Pflanzenmaterials sieben Tage nach der ersten Nitratzugabe erfolgte. Die Bestimmung des Gesamtstickstoffgehaltes geschah wie unter 5.3.6 dargestellt. Reste der stickstoffhaltigen Nährlösung wurden aus dem apoplastischen Raum der Wurzeln entfernt. Je Linie und Nitratstufe wurden drei Pflanzen analysiert. Zusätzlich wurde eine zweite biologisch unabhängige Probe analysiert. Es erfolgte ein zweiter zeitlich versetzter und unabhängiger Versuch. Die Ergebnisse für die Bestimmung des prozentualen Gesamtstickstoffgehaltes im Spross sind in der Abbildung 35 gezeigt. Die unabhängig genommenen Proben zeigten je Nitratstufe keine hohe Vergleichbarkeit. Auch die Versuche V1 und V2 zeigen relativ ähnliche hohe Werte. Zwischen den Linien selbst wurden nur geringe Unterschiede hinsichtlich ihres Stickstoffstatus gefunden. Auch die Reaktionen beider Linien auf die Stickstoffzugaben waren identisch. Bei SL und TH kam es zu einem starken Anstieg des prozentualen Stickstoffgehaltes bei hoher Nitratzufuhr.

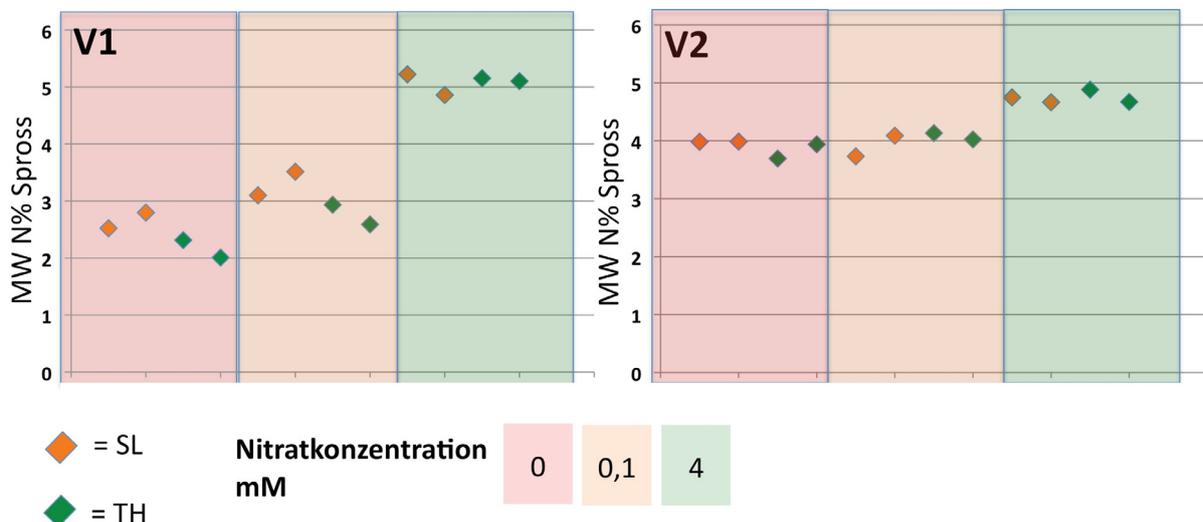


Abbildung 35. Prozentualer Gesamtstickstoffgehalt im Spross der beiden Elternlinien SL und TH sieben Tage nach der ersten Nitratzugabe.

In den beiden Diagrammen sind die Ergebnisse für den Gesamtstickstoffgehalt im Spross der Linien SL und TH sieben Tage nach der ersten Nitratzugabe dargestellt. Das linke Diagramm gibt die Ergebnisse für den ersten Versuch (V1), das rechte für den zweiten unabhängigen Versuch (V2) wieder. Die dargestellten Werte sind bereits die Mittelwerte aus der technischen Doppelbestimmung der Elementaranalyse. Die biologisch unabhängigen Wiederholungen für eine Linie bei einer Nitratkonzentration lieferten stets ähnliche Ergebnisse. Zwischen SL und TH waren nur minimale Unterschiede zu messen. Steigende Nitratkonzentrationen führten im Spross zu prozentual höheren Gesamtstickstoffgehalten.

Bei der Analyse des Wurzelgewebes zeigte sich ein vergleichbares Bild (Abbildung 36). Nur befand sich der Stickstoffstatus in der Wurzel auf niedrigerem Niveau. Im Versuch V1 wurde für beide Elternlinien bei hoher Stickstoffzufuhr ein sehr starker Anstieg des prozentualen Gesamtstickstoffgehaltes im Wurzelmaterial gefunden.

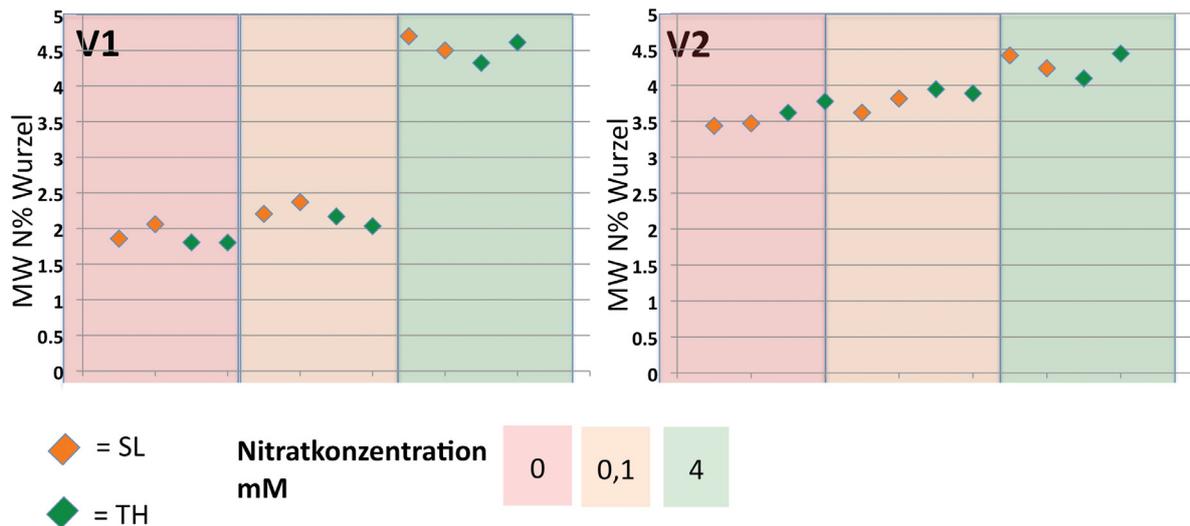


Abbildung 36. Prozentualer Gesamtstickstoffgehalt in den Wurzeln der Elternlinien SL und TH sieben Tage nach der ersten Nitratzugabe.

Gezeigt sind die Ergebnisse für die Bestimmung des Gesamtstickstoffgehalts im Spross der Linien SL und TH sieben Tage nach der ersten Nitratzugabe. Das linke Diagramm gibt die Ergebnisse für den ersten Versuch (V1), das rechte für den zweiten unabhängigen Versuch (V2) wieder. Die dargestellten Werte sind bereits die Mittelwerte aus der technischen Doppelbestimmung der Elementaranalyse. Auch für die biologisch unabhängigen Wiederholungen des Wurzelgewebes wurden ähnliche Resultate erzielt. Ebenso waren zwischen SL und TH nur minimale Unterschiede zu messen. Steigende Nitratkonzentrationen führten auch in der Wurzel zu prozentual höheren Gesamtstickstoffgehalten. Die absoluten Werte waren in der Wurzel aber konstant niedriger als im Spross.

Für alle genommenen Proben wurde auch deren Masse bestimmt (siehe 5.3.1, Daten nicht gezeigt) anhand der Trockenmasse und den Ergebnissen der C/N-Analyse wurde der Stickstoffnutzeffizienz-Index der Linien für die einzelnen Nitratstufen berechnet. Dieser berücksichtigt, wie viel Biomasse für den aufgenommenen Stickstoff erzeugt wurde. Hierzu wurde die folgende Formel für den Stickstoffnutzeffizienz-Index angewandt (siehe 5.3.6 und (Good et al., 2004)):

$$\text{Stickstoffnutzeffizienz-Index} = \frac{\text{MW Trockenmasse} \times (\text{MW Trockenmasse} / (\text{MW Trockenmasse} \times \text{MW N\%}))}{\text{MW Trockenmasse} \times \text{MW N\%}}$$

Zwischen den Linien SL und TH zeigten sich nur geringe Unterschiede (Abbildung 37). Bei einer Konzentration von 4 mM Stickstoff in der Nährlösung legten beide Elternlinien eine nahezu identische Stickstoffeffizienz an den Tag. Bei keiner oder nur geringer Stickstoffzufuhr zeigte die Line TH eine leicht höhere Stickstoffnutzeffizienz. Die in der Abbildung 35 gezeigten tendenziell niedrigeren Gesamtstickstoffgehalte im Versuch 1 bei einer Stickstoffkonzentration von 0,0 mM oder 0,1 mM spiegelten sich auch in der Berechnung des Stickstoffnutzeffizienz-Index wieder.

Auch für die entnommenen Wurzelsysteme wurde anhand von Stickstoffstatus und Trockenmasse der Proben der Stickstoffnutzeffizienz-Index dieses Gewebetyps bestimmt. Für die Linie TH wurde ein konstant geringfügig besserer Stickstoffnutzeffizienz-Index festgestellt (Abbildung 46), was die Tendenz der Berechnungen in der Abbildung 37 bestätigt. Auch der geringere Stickstoffstatus im Wurzelgewebe (siehe Abbildung 36) wirkte sich auf die berechnete Stickstoffnutzeffizienz aus.

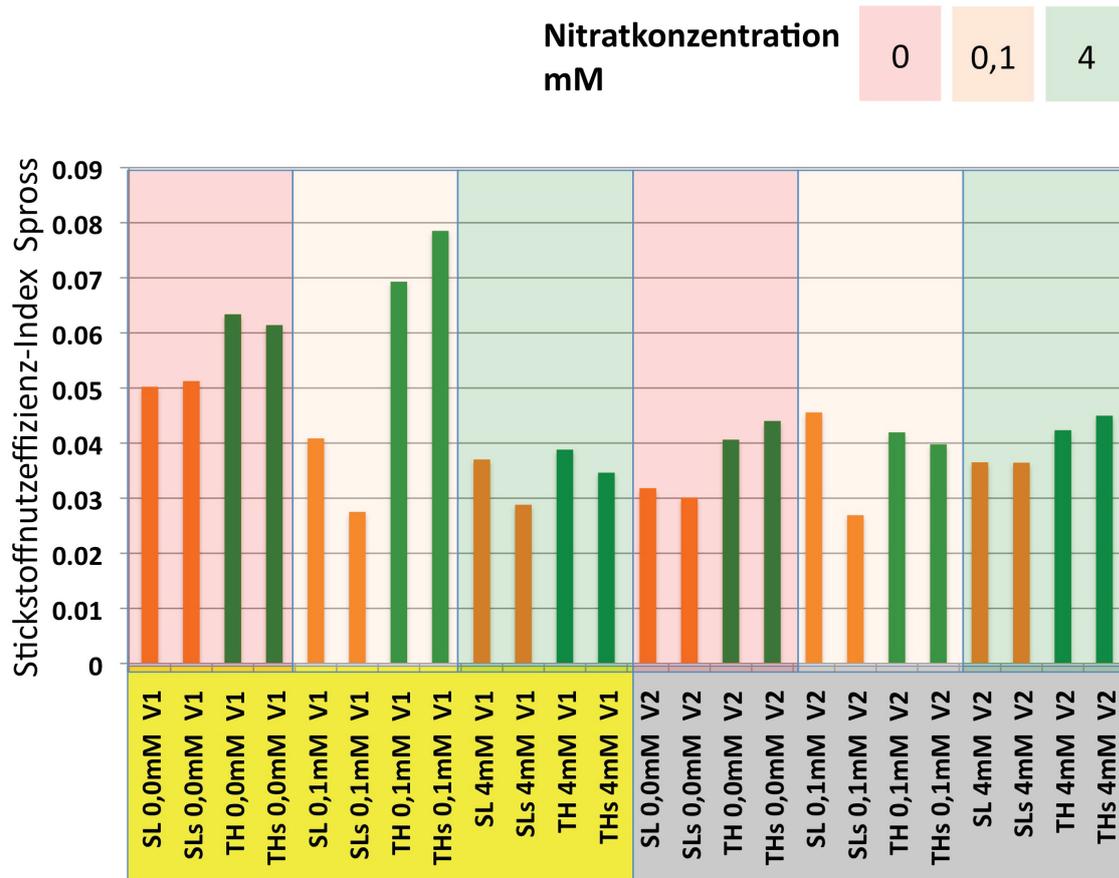


Abbildung 37. Berechneter Stickstoffnutzeffizienz-Index für das analysierte Sprossmaterial.

Das Säulendiagramm zeigt den jeweiligen berechneten Stickstoffnutzeffizienz-Index für die analysierten Sprosse. Es wurden jeweils die biologisch unabhängigen Wiederholungen paarweise aufgetragen. Die jeweilige Wiederholung wurde mit einem „s“ markiert. Die beiden Versuchsblöcke V1 und V2 zeigten für die höchste Nitratstufe keine grundlegenden Unterschiede zwischen den Linien SL und TH. Bei den Nitratzufuhren von 0,0 mM und 0,1 mM zeigte sich TH mit Ausnahme eines Falles als die geringfügig effizientere Linie.

6.3.3 Genetische Kontrolle von Transkriptomveränderungen der Elternlinien SL und TH bei unterschiedlicher Stickstoffzufuhr

6.3.3.1 Finden sich zwischen den Elternlinien SL und TH neben der phänotypischen Reaktion auch Unterschiede auf Ebene der genetischen Regulation?

Die Maislinien TH und SL besitzen eine unterschiedlich gute Stickstoffnutzeffizienz bezüglich des Kornertrages unter Mangelbedingungen (siehe 4.7). Es konnten deutliche Unterschiede der Reaktion auf Nitrat bezüglich der Lateralwurzelarchitektur gefunden werden (siehe 6.3.1). Zeigen beide Linien neben Unterschieden in der Effizienz und der Wurzelarchitektur auch Unterschiede in ihrer Reaktion bei der Zugabe von Stickstoff auf der Ebene der genetischen Regulation? Diese Frage wurde mit Hilfe der Hochdurchsatzsequenzierung von Transkriptomen analysiert. Ziel dieser Versuche war es einerseits zu Verifizieren, ob unterschiedliche genetische Reaktionen gibt - aber auch ob diese sich im zeitlichen Verlauf verschieden verhalten. Die Linien SL und TH wurden den in Abbildung 12 gezeigten Bedingungen von 0, 0,1 und 4 mM ausgesetzt und sowohl die RNS der Wurzelsysteme vor der Zugabe von Nitrat, als auch 4 h bzw. 28 h danach isoliert und weiter bearbeitet. Es wurden drei unabhängige biologische Wiederholungen durchgeführt. Dies ergab insgesamt 42 Proben, welche unabhängig voneinander bearbeitet wurden. Je Probe wurden 3 Wurzelsysteme vereint und gemeinsam bearbeitet. Anschließend wurden die erhaltenen Transkriptome der einzelnen Zustände und Linien sequenziert und analysiert.

Um sicher zu stellen, dass die korrekten Genotypen für die Experimente verwendet wurden, wurden neben der mRNA auch genomische DNA isoliert und mit genetischen Markern untersucht. Die Ergebnisse zeigten die Korrektheit des verwendeten Saatguts (siehe 9.2).

Die erhaltenen Sequenzdaten wurden mit dem Programm CLC auf das B73 Referenztranskriptom mit 136.770 Transkripten (5b+ gene model set for Refgen_v3, <http://www.maizegdb.org> (Andorf et al., 2016)) von Mais kartiert und wie in 5.6.5 beschrieben bearbeitet. Die sequenzierten mRNA-Stücke zeigten für 62.892 verschiedene Transkripte eine Expression. Eine Analyse der Rohdaten ergab für fast alle unabhängigen biologischen Replikate der Proben, dass sie vergleichbar waren. Nur eine

Einzelprobe wurde anhand der Ergebnisse für die einzelnen sequenzierten Transkriptome nicht weiter analysiert und für die Bildung der Mittelwerte verwendet (siehe 9.3).

Nach dem Aussortieren der Transkripte, welche zu keinem der Zeitpunkte einen RPKM ≥ 1 besaßen blieben 41.189 Transkripte, welche dieses Kriterium für SL oder TH erfüllten. Auf Grundlage dieses Datensatzes wurden weitere Analysen durchgeführt.

6.3.3.2 Die Linien TH und SL zeigten *per se* ein global unterschiedliches Transkriptomverhalten und auf Nitratzugaben der gleichen Stärke ähnliche Reaktionen

Die Linien TH und SL zeigten unter Feldbedingungen in viererlei Bezug phänotypisch große Unterschiede. Die in dieser Dissertation behandelte Stickstoffnutzeffizienz war nur eine Divergenz. Eine PCA der normalisierten Werte beider Linien zum Zeitpunkt 0 und ohne Nitratzugabe zeigte, dass sich beide Linien *per se* in ihrem Transkriptomverhalten unterscheiden (Abbildung 38). Die Unterschiede im Transkriptomverhalten der Wurzelsysteme waren also auch ohne Nitratzufuhr unterschiedlich. Vergleicht man dies mit der kurzfristigen Reaktion (Daten nicht gezeigt) nach 4 h, zeigten sich zunächst keine größeren Änderungen. Beide Linien zeigten erneut ein grundsätzlich divergentes Transkriptomverhalten. Allerdings begannen 4 h nach der Einstellung der unterschiedlich hohen Nitratkonzentrationen die jeweiligen Replikate mit Stickstoffzufuhr sich von denen ohne diese zu entfernen. Dieser Trend war 24 h später, also 28 h nach der ersten Stickstoffzufuhr deutlicher zu sehen (siehe Abbildung 39). Diese PCA zeigte, dass die genetischen Unterschiede der Linien SL und TH größer sind als die Reaktion auf Nitrat. Beide Linien reagieren auf die Stickstoffkonzentrationen im Nährmedium von 0,1 mM und 4 mM ähnlich. Beide Bedingungen führten jeweils zu einer Bewegung der Punkte in gleiche Projektionsrichtungen. Gleichzeitig zeigen die PCA der Abbildung 38 und Abbildung 39 auch die gute Vergleichbarkeit der Wiederholungen der Einzelexperimente.

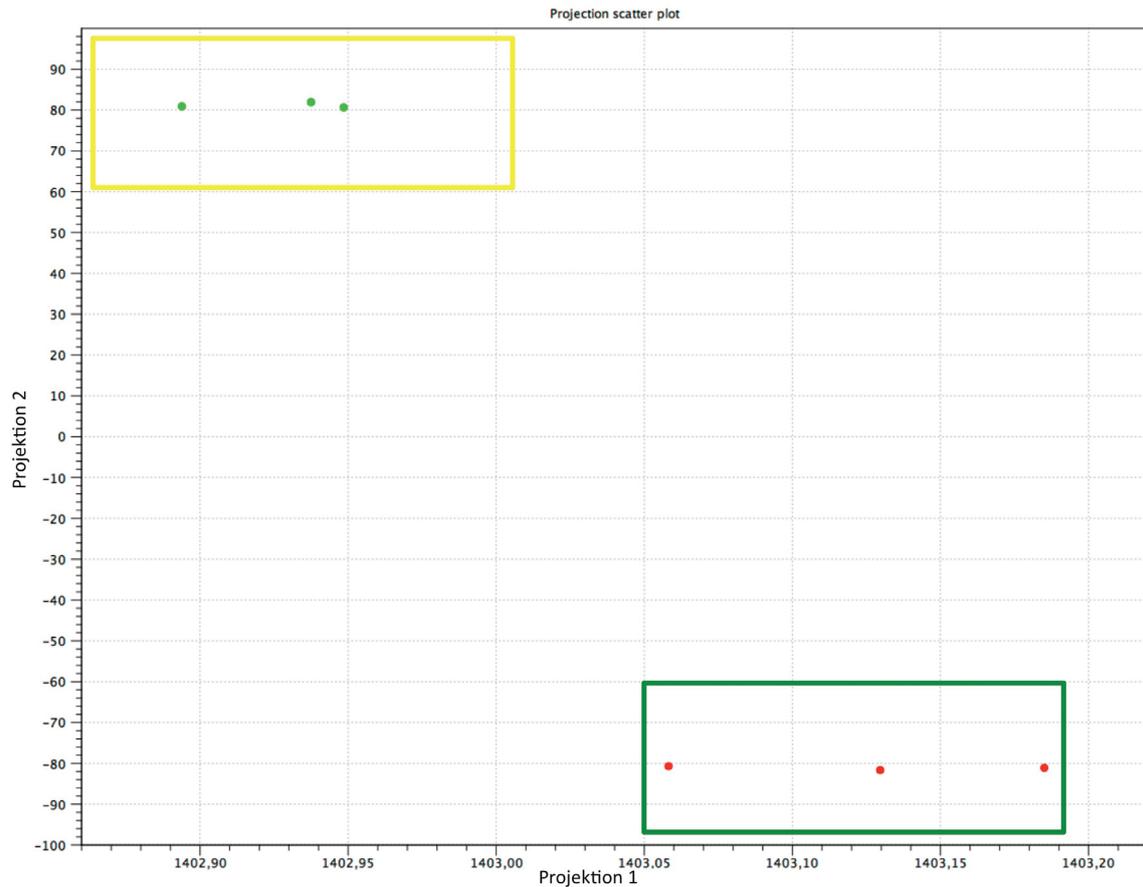


Abbildung 38. PCA der normalisierten Werte der Einzelerperimente zum Zeitpunkt 0 und ohne Nitratzugabe. Dargestellt ist die PCA beider Elternlinien zum Zeitpunkt 0. Es sind zwei verschiedene Projektionsebenen gegeneinander dargestellt. Innerhalb dieser beiden Projektionsebenen liegen die jeweiligen Relikate der Elternlinien jeweils nah beieinander. Die roten Punkte (grüner Kasten) zeigen die Replikate für die Linie TH, die grünen Punkte (gelber Kasten), die der Line SL. Die PCA zeigt, dass sich SL und TH grundsätzlich in ihrem genetischen Expressionsverhalten der Wurzelsysteme unterscheiden. Zum Zeitpunkt der Probennahme stand den Versuchspflanzen ein Vollmedium ohne Stickstoff zur Verfügung.

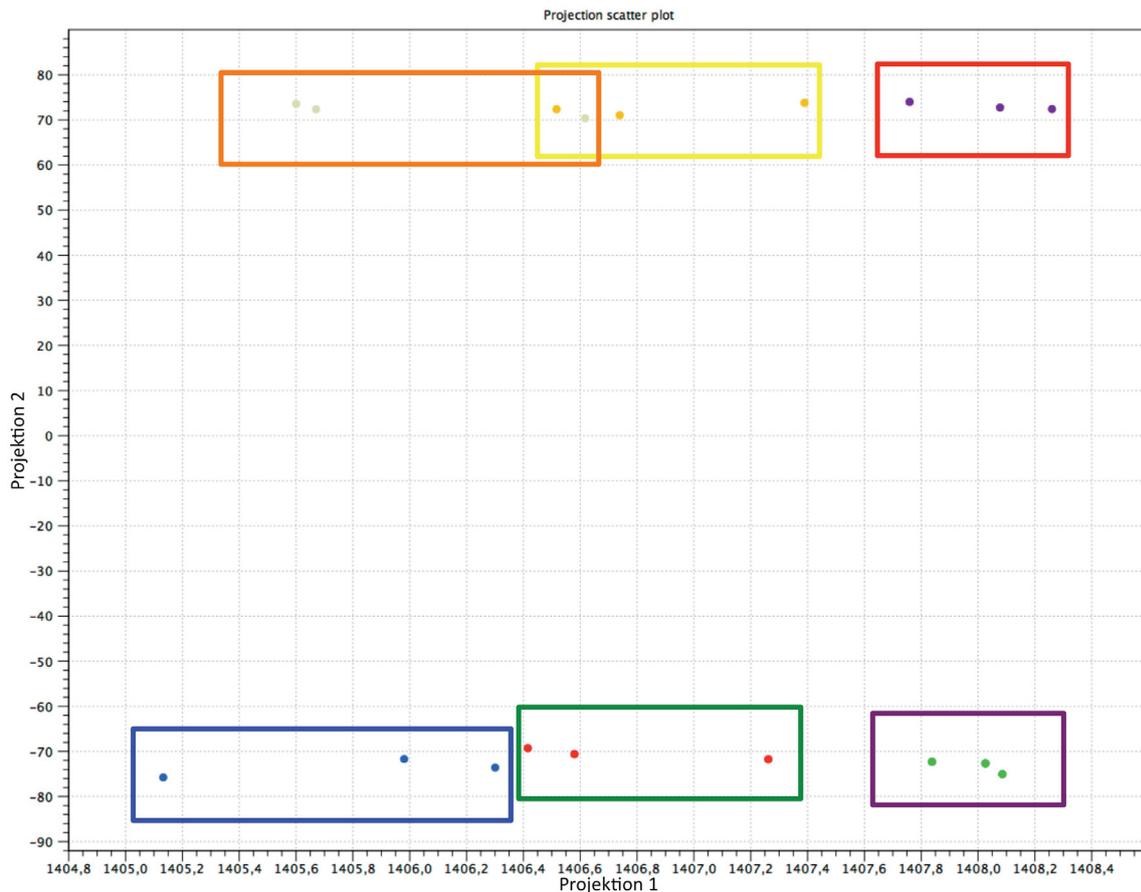


Abbildung 39. PCA beider Eltern 28 h nach der ersten Nitratzufuhr.

Dargestellt ist die PCA beider Elternlinien 28 h nach der ersten Nitratzufuhr. Es sind zwei verschiedene Projektionsebenen gegeneinander dargestellt. Innerhalb dieser beiden Projektionsebenen liegen die jeweiligen Relikate der Elternlinien SL und TH auch bei unterschiedlich hoher Nitratzufuhr jeweils nah beieinander gruppiert. Die roten Punkte (grüner Kasten) zeigen die drei Replikate für die Linie TH 28 h später ohne Stickstoffzufuhr, die grünen Punkte (violetter Kasten) der Linie TH nach 28 h bei 0,1 mM Nitrat und die blauen Punkte (blauer Kasten) bei 4 mM Nitrat ebenfalls nach 28 h. Die gelben Punkte (gelber Kasten) geben die Lage der Replikate von SL 28 h nach der ersten Probennahme ohne Stickstoffzufuhr wieder. Die violetten Punkte (roter Kasten) geben die Lage der Linie SL 28 h bei 0,1 mM Nitrat, die der grauen Punkte (oranger Kasten) bei 4 mM Nitrat wieder. Die transkriptomale Expression beider Linien zeigte sich unterschiedlich, die Reaktion nach 28 h auf die unterschiedlichen Stickstoffzufuhren läuft aber nach einen vergleichbaren Muster ab.

6.3.3.3 Reaktion der genetischen Kontrolle des Transkriptomverhaltens der Linien SL und TH auf unterschiedlich starke Nitratzufuhren

Eine erste Analyse sollte die Änderung der genetischen Kontrolle des Transkriptoms der Elternlinien verifizieren und aufzeigen, ob es eine unterschiedliche Reaktion der beiden

Linien auf die Zugabe von Nitrat im Nährmedium gibt. Hierzu wurden zunächst für die Linien SL und TH separat alle Transkripte aussortiert, welche einen RPKM < 1 besaßen.

Für die Linie TH blieben nach diesen Schritt 38.845 Transkripte, für die Linie SL 38.467 Transkripte über. In einem zweiten Schritt wurden weiterhin alle Transkripte herausgefiltert bei denen die Bonferoni-Korrektur im intraliniären Vergleich der Zeitpunkte und Nitratstufen Werte von $\geq 0,05$ zeigten. Diese stringente Filterung führte zu einem jeweiligen Satz von 5.212 Transkripten bei der Linie TH und 5.005 Transkripten bei der Linie SL, welche bei mindestens einem Vergleich signifikant differentiell exprimiert waren. Diese Datensätze wurden wie unter 5.6.5 beschrieben weiter analysiert. Aufgrund der Ergebnisse einer Hierarchischen Clusteranalyse (nicht gezeigt) und der Stabilität der Cluster wurde bei beiden Linien eine k-Gruppenanzahl von 20 gewählt. Die Clusteranalyse der Linie SL zeigte bei den meisten Clustern eine Reaktion des Expressionsverhaltens auf Nitrat (Abbildung 40). Insgesamt befanden sich für die Linie SL 1189 Gene in den Clustern 5, 7, 15, 17, 19 und 20, welche als Reaktion aufsteigende Nitratkonzentrationen unabhängig vom Zeitpunkt gleichfalls steigende mRNA-Pegel zeigten. Bei der Linie TH zeigten in vergleichbaren Clustern (Cluster 2, 6, 10 und 12) 1307 Gene eine ähnlichen Trend (Abbildung 41). Bei der Linie TH konnte damit insgesamt für mehr Gene gezeigt werden, dass sie auf Nitratzufuhr unabhängig vom zeitlichen Verlauf mit einer steigenden Transkriptionsrate reagieren. 2068 Transkripte zeigten bei der Linie SL eine meist leichte Abregulation nach den Nitratzufuhren (Cluster 1, 6, 9, 10, 11 und 16, Abbildung 40), bei der Linie TH traf dies auf 1799 Transkripte zu (Cluster 3, 11, 15, 16, 19 und 20 Abbildung 41). Damit zeigte die Linie SL für mehr Transkriptpegel eine sinkende Tendenz nach der Zufuhr von Nitrat. Das genannte Cluster 16 zeigte eine interessante Reaktion, 28 h nach niedriger Nitratzufuhr, kommt es bei SL zu einer Hochregulation der Gene des Clusters. Vielleicht handelte es sich dabei um eine erste langfristige Reaktion auf niedrige Stickstoffbedingungen.

Die Linie SL ließ in Clustern 12, 13, 14 und 18 (Abbildung 40) eine langfristig positive Antwort für 874 unterschiedliche Transkriptpegel erkennen, TH dagegen nur für 708 Transkripte (Cluster 5, 7, 8 und 13, Abbildung 41). Der umgekehrte Fall, also eine Herabregulation von mRNA-Pegeln nach längere Nitratzufuhr, konnte bei TH für 385 Gene festgestellt werden (Cluster 20, Abbildung 41), bei SL nur für 356 Gene (Cluster 4, Abbildung 40). Ebenfalls wurde eine kurzfristige Reaktion verschiedener Gene auf eine Nitratzugabe beobachtet. Vier Stunden nach der ersten Nitratzufuhr zeigten bei SL 295

Transkriptpegel einen Anstieg (Cluster 2 und 20, Abbildung 40) und 145 Transkripte kurzzeitig sinkende Pegel (Cluster 3 und 8, Abbildung 40). TH wies eine vergleichbare Reaktion in der Änderung des Transkriptomverhaltens mit kurzzeitigen Anstieg in den Clustern 2 und 4 (Abbildung 41) für 472 Gene auf und eine Herabregulation für 320 Gene auf (Cluster 14 und 17, Abbildung 41). Die Linie TH zeigte damit kurzfristig eine stärkere positive Reaktion auf Nitrat, bei der Linie SL dagegen fiel die langfristige Reaktion stärker positiv aus.

Verglich man global die Muster dieser Cluster mit denen des direkten Vergleichs der Linien aus 6.3.3.4, so fiel auf, dass die interne Reaktion der differentiell exprimierten Gene weniger stark ausfiel. Nur die Transkriptpegel in den Clustern 5 und 17 bei SL (Abbildung 40) und in den Cluster 4 und 10 bei TH (Abbildung 41) zeigten, eine abrupte Änderung ihres Transkriptomverhaltens bei Nitratzufuhr. Eine Analyse der Anreicherung von bestimmten Annotationen der Cluster in der Abbildung 40 und Abbildung 41 konnte für keines des Cluster eine Anreicherung von im Stickstoffstoffwechsel direkt beteiligten Transkripten zeigen. Die Untersuchungen mit dem Onlinewerkzeug AgriGO, ergab dagegen einen fast nahezu konstanten Einfluss der unterschiedlich starken Nitratzufuhren auf Metabolische Prozesse und Signale für alle Cluster, sowohl bei der Linie SL als auch bei der Linie TH. Gleichfalls konnte für fast alle Cluster von SL und TH eine Anreicherung von Transkripten gefunden werden, die in Zusammenhang mit der Antwort auf einen Stimulus stehen (Daten von AgriGO nicht gezeigt).

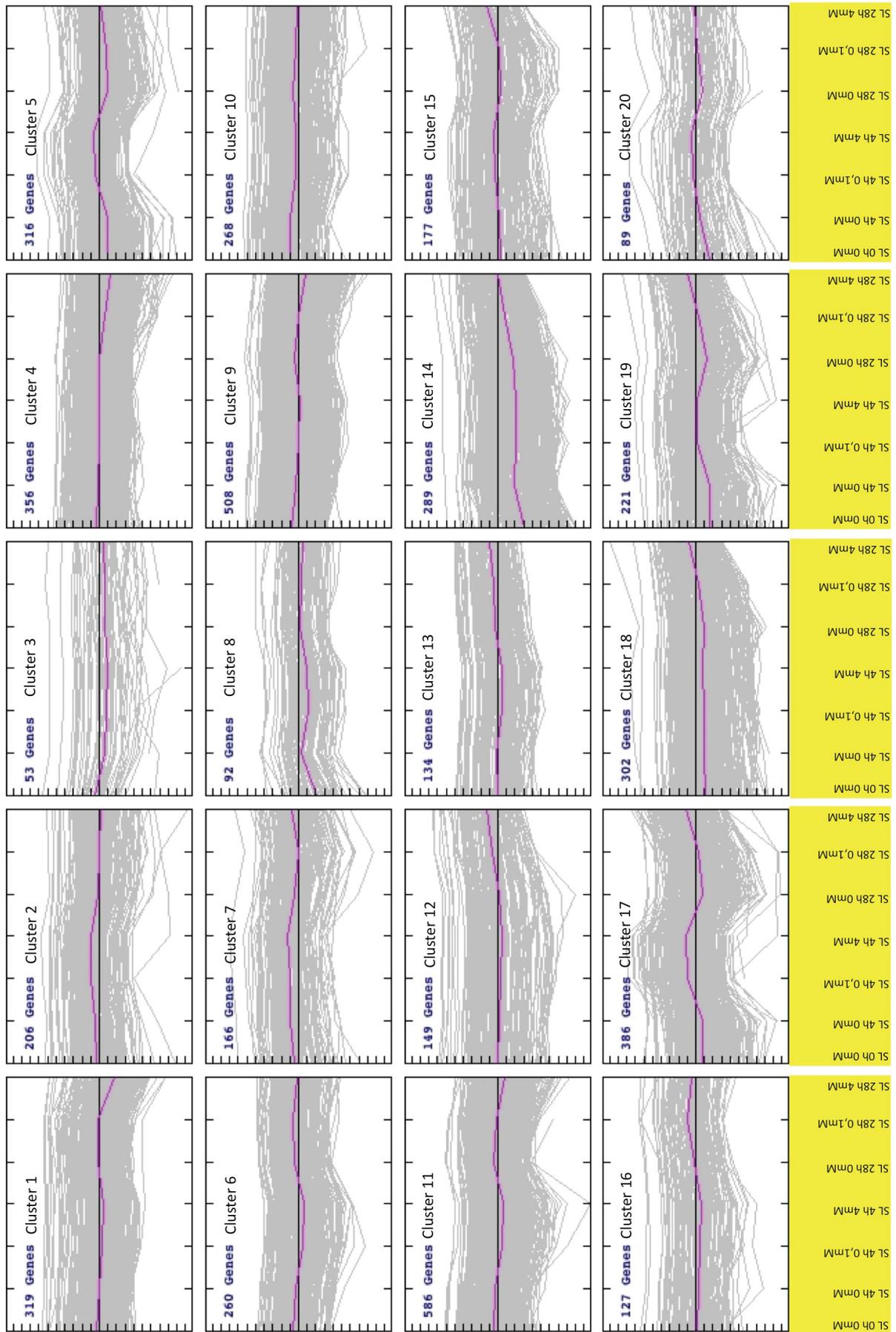


Abbildung 40. Übersicht der Ergebnisse der Clusteranalyse für den Elter SL.

Die Ergebnisse der separaten Clusteranalyse der für die Linie SL differentiell exprimierten Gene zeigten eine Reaktion auf Nitrat. Das mit 586 Genen größte Cluster (Cluster 11) zeigt Transkripte, welche bei steigenden Nitratkonzentrationen schwächere Expressionenlevel zeigten. Die Cluster 5, 7, 15, 17 und 19 zeigten dagegen Transkripte bei dem es zum Anstieg der Expressionsniveaus – bei steigenden Nitratkonzentrationen kam. Sowohl kurzfristige (Cluster 2 und 20), als auch langfristige (Cluster 12, 13, 14 und 18) positive Reaktionen auf Nitrat waren erkennbar. Auch Cluster mit Transkripten, welche nach 28 h nach Nitratzugabe eine langfristig abnehmende Transkription (Cluster 1 und 4) zeigten, waren zu beobachten.

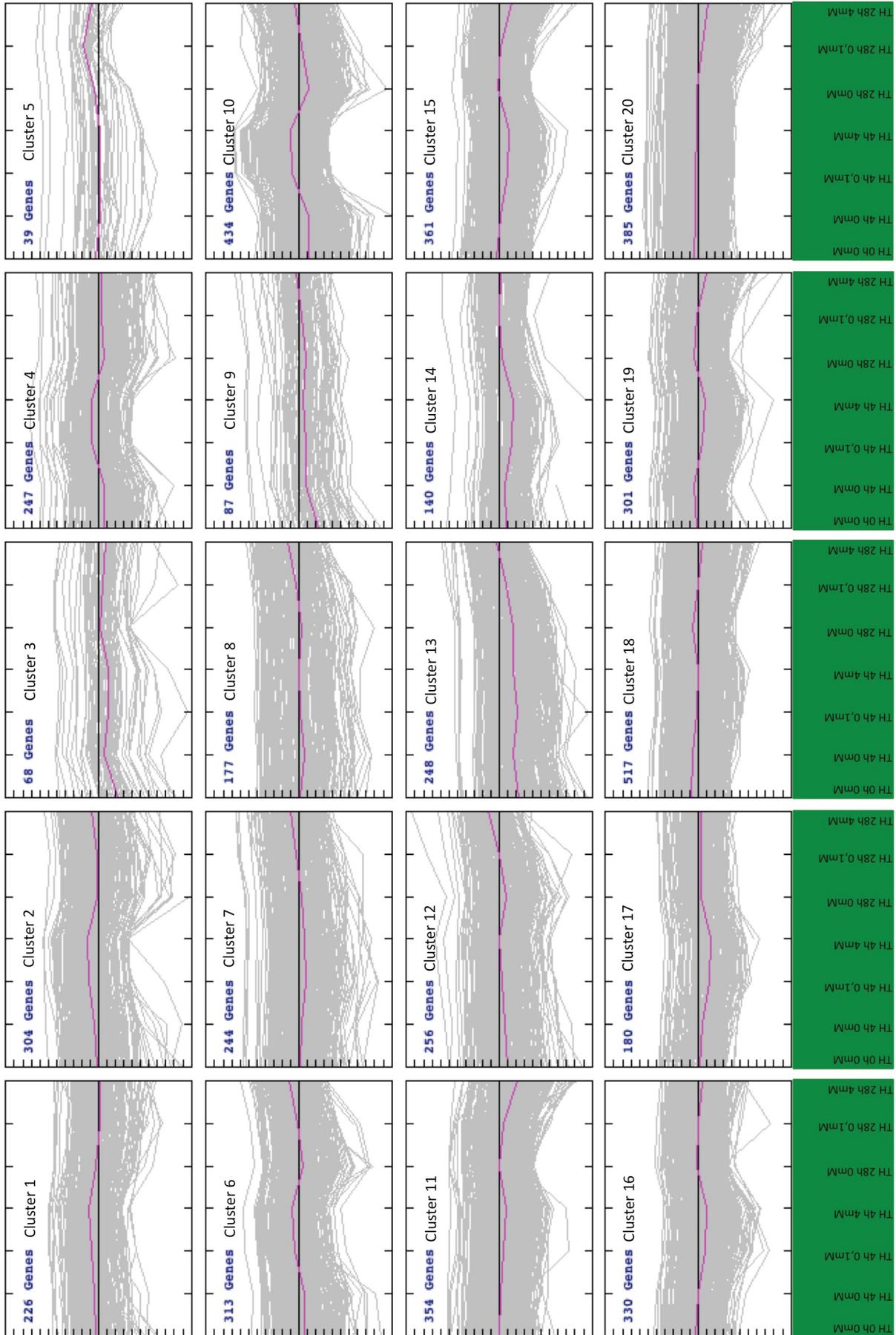


Abbildung 41. Übersicht der Ergebnisse der Clusteranalyse für den Elter TH.

Die Ergebnisse der separaten Clusteranalyse der für die Linie TH differentiell exprimierten Gene zeigten ebenfalls eine Reaktion auf Nitrat. Das mit 434 Transkripten größte Cluster (Cluster 10) beinhaltete Gene, welche eine steigende Expressionswerte bei steigender Stickstoffzufuhr zeigten. Auch die Cluster 2, 6, und 12 zeigten Gene bei dem es zum Anstieg der Expressionsniveaus – bei steigenden Nitratkonzentrationen kam. Die Cluster 11, 15 und 19 beinhalteten Transkripte mit einer zu den Clustern 2, 6, 10 und 12 inversen Reaktion.

6.3.3.4 Direkter Vergleich der molekularen Antwort auf die Stickstoffmenge der Linien SL und TH

Für den Vergleich der Elternlinien wurde der Datensatz aus 6.3.3 erneut gefiltert. In diesem Fall wurden alle Transkripte herausgefiltert bei denen die Bonferroni-Korrektur im direkten Vergleich von SL und TH bei gleicher Nitratstufe und gleichen Zeitpunkte p-Werte von $\geq 0,05$ zeigten. Diese stringente Filterung ergab eine Liste von 9.754 exprimierter Gene, welche sich mindestens in einem der direkten Vergleiche zwischen TH und SL signifikant unterschiedlich verhielten. Dieser Datensatz wurde wie unter 5.6.5 beschrieben weiter analysiert. Anhand der Ergebnisse einer Hierarchischen Clusteranalyse und der experimentell bestimmten Stabilität der Cluster wurde eine k-Gruppenanzahl von 26 gewählt.

Die von der Transkriptanzahl her dominieren Cluster waren diejenigen bei denen die Gene jeweils nur bei SL oder TH eine hochregulierte Expression zeigten nahezu keine Reaktion auf die Nitratzugabe erkennen ließen. Zu dieser Kategorie, der Cluster bei denen nur bei SL hohe mRNS-Pegel gefunden wurden, gehören die Cluster 15 und auch die Cluster 16 und 19 (Abbildung 42) und damit zeigten insgesamt 2374 Gene diesen Trend. Im Cluster 15 befanden sich Gene mit höheren Werten für die normalisierten Expressionswerte als in den Clustern 16 und 19. Erwartungsgemäß konnten auch für den umgehrten Trend Cluster gefunden werden. Die Cluster 7, 4 und 5 (Abbildung 42) beinhalten gemeinsam 2600 Gene welche konstitutiv bei der Linie TH exprimiert waren und keinen Einfluss auf Nitrat zeigten.

Die Cluster 11, 14 und 17 beinhalteten 662 Transkripte, welche eine stark positive Reaktion auf Nitratgaben zeigten. Bei steigenden Nitratkonzentrationen zeigten beide Elternlinien für diese Gene eine verstärkte mRNA-Expression (Abbildung 42). Auch die Analyse mit dem Onlinewerkzeug AgriGO bestätigte, dass in es in diesem Cluster eine

Anreicherung von Transkripten gab, die auf Nitrat reagieren. Im Cluster 11 war eine zweifache Anreicherung von Transkripten des Stickstoffstoffwechsels und Transkripten die den Stickstoffstoffwechsel regulieren zu finden. Das Cluster 14 wies sogar eine dreifache Anreicherung für Transkripten auf, welche in der Regulation des Stickstoffstoffwechsels involviert sind. Es machte sich, eine Anreicherung von Transkripten die in Verbindung mit Stickstoffverbindungen im Metabolismus oder auf zellulärer Ebene stehen bzw. von Transkripten welche solche Gene wiederum regulieren, im Cluster 17 bemerkbar. Weiterhin konnte für die konstitutiv höher expremierten Gene von TH im Cluster 7 eine zweifache Anreicherung von expremierten Genen festgestellt werden, die in den Metabolismusprozess zellulärer Stickstoffverbindungen betreffen (Abbildung 42, Daten von AgriGO nicht gezeigt).

Der Verlauf der Transkriptpegel innerhalb des Clusters 21 zeigte eine langfristige Reaktion auf hohe Nitratkonzentrationen. Bei SL und TH erreichten die Transkripte dieses Clusters nach 28 h und einer Nitratkonzentration von 4 mM ihr höchstes Niveau. Innerhalb des Clusters 21 konnte mittels AgriGO eine drei- bis vierfache Anreicherung für Transkripte gefunden werden, die laut Annotation in der Biosynthese von Nitratverbindungen, dem Aminmetabolismus (auch zellulär), der Aminbiosynthese und dem zellulären Metabolismus von Stickstoffverbindungen bzw. Aminosäuren verwickelt sind. Ein ähnliches Ergebnis konnte auch für das Cluster 18 festgestellt werden (Daten von AgriGO nicht gezeigt). Im Unterschied zum Cluster 21 fiel hier die langfristige Reaktion weniger stark aus. Beide Cluster stellten insgesamt 626 Transkripte Auch das Cluster 24 zeigt eine langfristige Reaktion auf Nitratzufuhr. Innerhalb der 200 Transkripte des Clusters 24 fand sich allerdings keine Anreicherung von Transkripten, die in den Stickstoffstoffwechsel direkt involviert waren (Abbildung 42, Daten von AgriGO nicht gezeigt).

Übergreifend konnte für alle Cluster beobachtet werden, dass beide Linien SL und TH stets eine identische transkriptionelle Reaktion zeigten. Unterschiede im Transkriptionsverhalten konnten, abgesehen von grundsätzlich unterschiedlichen Transkriptpegeln, nicht festgestellt werden. Aber auch diese grundsätzlichen Unterschiede zeigten für beide Linien die gleiche Tendenz. Dies deckte sich mit den Ergebnissen der PCAs (6.3.3.2).

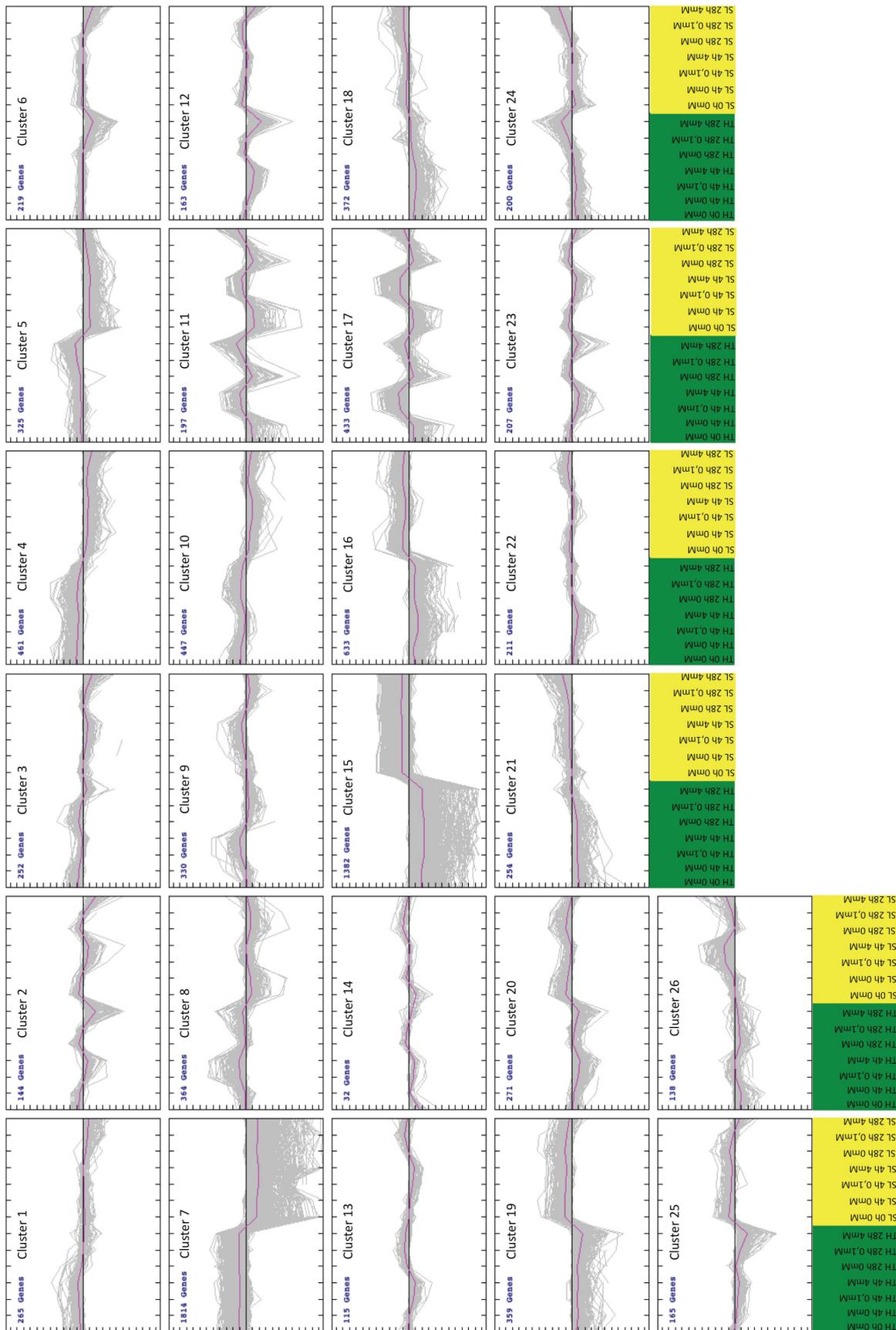


Abbildung 42. Übersicht der Clusteranalyse der differentiell exprimierten Gene des direkten Vergleichs von TH und SL zu allen Zeitpunkten und Nitratstufen.

Die Übersicht gibt die Ergebnisse der direkt vergleichenden Clusteranalyse der Linien TH und SL wieder. Die

Cluster wurden aufgrund ihrer Reihenfolge nummeriert. Bei den untersten Clustern wurden beispielhaft die Bezeichnungen angefügt. Der Zeitpunkte und Bedingungen von TH sind grün, die von SL gelb hinterlegt.

6.3.3.5 Charakterisierung und Analyse des Transkriptionsverhaltens potentieller Kandidatengene bei den Elternlinien SL und TH

Im Zuge der Analyse der RNS-Pegel der Elternlinien wurden die in der Literatur bekannten und in Datenbanken annotierten Gene analysiert, welche bezüglich der Aufnahme von Nitrat in die Pflanzenwurzel oder der Wurzelarchitektur für Mais relevant sind. Es sollte überprüft werden, ob die unterschiedliche Stickstoffnutzeffizienz der Elternlinien möglicherweise auf Unterschiede in der RNS-Expression begründet sein könnten.

Die gezielte Aufnahme von Nitraten geschieht in der Maiswurzel durch Nitrattransporter. Die Identifikationsnummern aus der hierfür in Mais bekannten Gene aus der Datenbank (<http://www.maizegdb.org>, (Andorf et al., 2016)) wurde mit denen abgeglichen, welche im Datensatz der sequenzierten Transkriptome vorhanden waren. Je Linie, Zeitpunkt und Bedingung wurden soweit möglich die Mittelwerte der RPKMs für die drei unabhängigen Experimente gebildet. Für nicht aufgeführte Gene konnte mit der gewählten Methode keine Expression festgestellt werden. Die Ergebnisse dieser Analyse sind in der Tabelle 3 zusammengefasst. Für die meisten Transporterproteine der NRT-Genfamilie zeigen beide Elternlinien eine vergleichbare Reaktion bei den unterschiedlichen Nitratzugaben. Für die Gene NRT1 und NRT2 wurde ein ähnliches Expressionsverhalten gefunden. Beide Linien zeigen für diese Nitrattransporter einen kurzfristigen Anstieg der Transkriptpegel 4 h nach Stickstoffzugabe. Die Reaktion wird bei höheren Stickstoffgaben nur geringfügig stärker und führt zu bis 23fach höheren Transkriptmengen gegenüber den Pflanzen ohne Nitratzufuhr. 28 h nach Nitratzugabe zeigen beide Linien deutlich geringere Transkriptmengen, wobei bei stärkerer Nitratzufuhr es auch zu einer über 50 % stärkeren Herunterregulierung dieser mRNS-Pegel kommt.

Tabelle 3 Übersicht der RPKM Mittelwerte für in der Literatur bekannte Kandidatengene

In der Tabelle sind die Mittelwerte der RPKMs der Linien TH und SL für die drei biologisch unabhängigen Experimente bei verschiedenen Nitratzufuhren im zeitlichen Verlauf dargestellt. Neben dem Gennamen ist die chromosomale Lage angegeben. Wurden von einem Gen mehrere Transkriptvarianten gefunden, wurden diese zusammengefasst.

Gen	Chromosom	SL 0 mM 0 h	SL 0 mM 4 h	SL 0,1 mM 4 h	SL 4 mM 4 h	SL 0 mM 28 h	SL 0,1 mM 28 h	SL 4 mM 28 h	TH 0 mM 0 h	TH 0 mM 4 h	TH 0,1 mM 4 h	TH 4 mM 4 h	TH 0 mM 28 h	TH 0,1 mM 28 h	TH 4 mM 28 h
<i>NRT1</i>	4	48.20	103.75	709.88	792.98	75.95	259.33	224.22	44.43	37.51	810.97	892.27	57.53	320.03	143.37
<i>NRT2</i>	4	57.45	83.47	373.02	400.94	64.53	165.74	108.14	56.46	34.66	410.87	447.03	54.82	187.82	76.38
<i>NRT3</i>	5	0.78	3.18	2.63	3.25	3.11	5.14	3.33	0.68	3.28	1.76	2.42	2.76	4.75	2.99
<i>NRT4</i>	2	0.33	0.12	0.17	0.08	0.24	0.33	0.17	0.67	0.32	0.28	0.17	0.78	1.20	0.44
<i>RTCL1</i>	9	3.28	3.13	3.53	2.77	3.25	1.92	2.75	0.10	0.42	0.72	0.28	0.20	0.37	0.38
<i>RTH1</i>	1	42.82	40.65	36.41	34.30	37.79	36.06	30.70	38.90	38.59	35.37	32.51	36.21	34.41	30.92
<i>RTH3</i>	1	7.64	5.39	5.59	6.50	6.31	5.84	5.72	7.06	5.00	6.15	6.15	5.53	6.52	6.65
<i>RTCS1</i>	1	2.58	2.40	3.66	3.65	3.19	3.04	3.81	2.47	2.42	3.87	3.32	2.68	3.38	2.53
<i>RUL1</i>	8	51.16	49.30	48.41	46.45	44.45	42.58	41.14	43.69	44.08	41.21	37.19	36.40	37.30	33.66
<i>RUM1</i>	3	29.25	30.89	32.51	30.52	29.39	28.59	29.02	27.23	30.84	27.68	26.43	25.90	27.83	25.61

Auch der mRNA-Pegel des Nitrattransporters *NRT3* zeigt bei beiden Linien ähnlich hohe Expressionswerte. Die stickstoffeffiziente Linie SL zeigt hierbei leicht höhere Werte. Im Gegensatz zu *NRT1* und *NRT2* zeigt *NRT3* beim Vergleich der Zeitpunkte von 0 h und 4 h bzw. 28 h einen circadianen Einfluss und zeigt keinen Abfall des Transkriptpegels nach 28 h. Bei der niedrigen äußeren Nitratkonzentration von 0,1 mM konnte nach 28 h der höchste Pegel an mRNA von *NRT3* festgestellt werden (Tabelle 3 und Abbildung 43 A).

Innerhalb der *NRT*-Familie konnte nur für den schwach exprimierten Nitrattransporter *NRT4* eine bei den Linien unterschiedliche Expression nachgewiesen werden. Die höheren Transkriptwerte wurden bei der stickstoffineffizienteren Linie TH festgestellt und zeigen ihr Maxima von einem RPKM von 1,2 nach 28 h und bei geringer Nitratzugabe (Tabelle 3 und Abbildung 43 B).

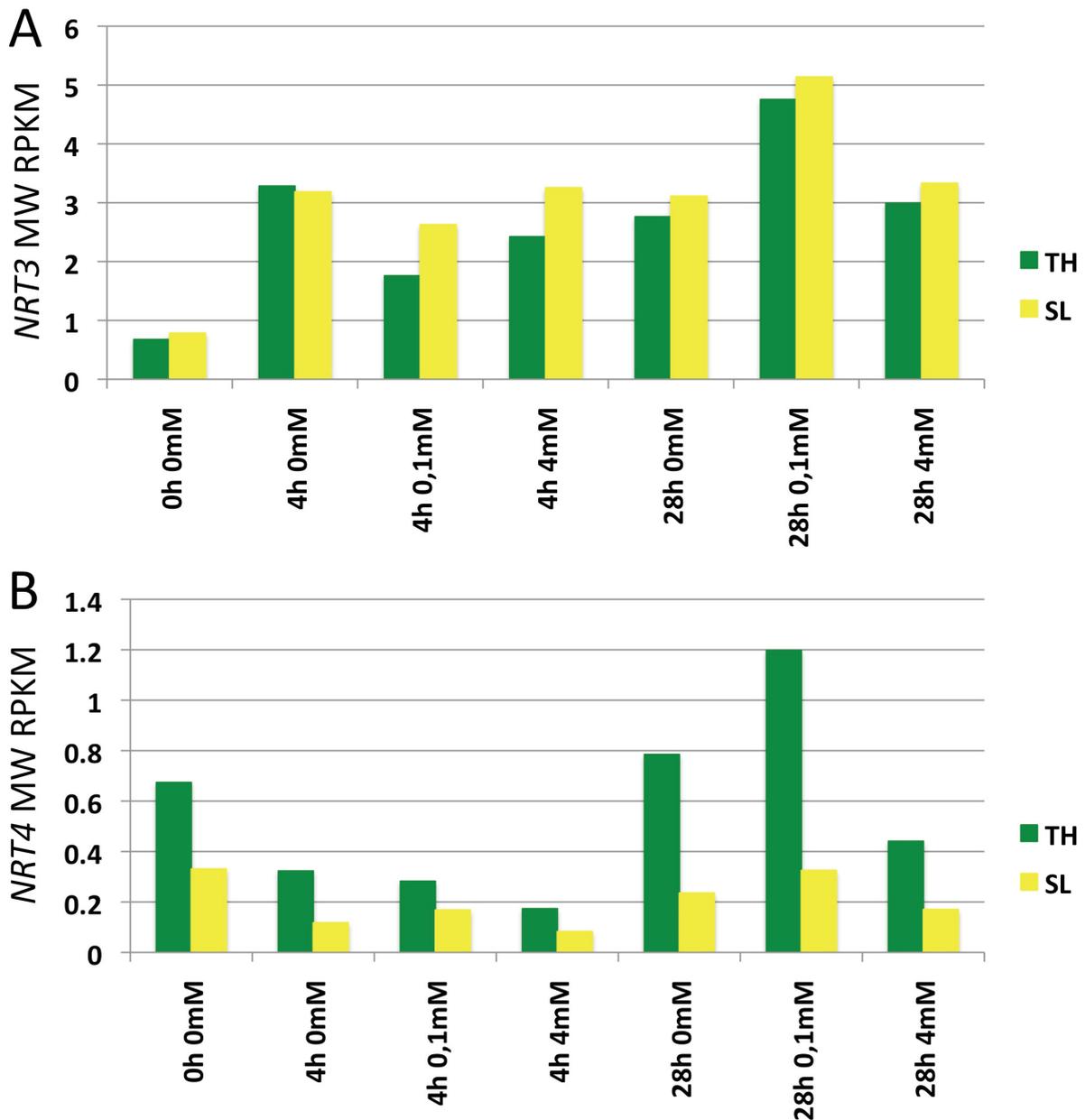


Abbildung 43 Mittelwerte der RPKM für *NRT3* und *NRT4* bei verschiedenen Nitratstufen und Zeitpunkten

Es sind die berechneten Mittelwerte der RPKM für die unterschiedlich aufgenommenen Zeitpunkte (0 h, 4 h und 28 h) bei den Nitratstufen 0 mM, 0,1 mM und 4 mM dargestellt. Das Säulendiagramm A zeigt dies für *NRT3*, Das Säulendiagramm B für *NRT4*. Beide Nitrattransporter zeigen Unterschiede für die Transkriptpegelhöhe im zeitlichen Verlauf. *NRT4* zeigte für die Linie TH höhere RPKM-Werte als für die Linie SL.

Anhand der erhobenen Daten konnten auch Gene untersucht werden, welche für die Entwicklung der homorhizen Wurzelarchitektur von *Zea mays* essentiell sind (siehe 4.3). Eine Übersicht der RPKM-Werte befindet sich für diese Gene in der in der Tabelle 1. Für *RUL1*, *RUM1*, *RTH1* und *RTH3* wurde kein unterschiedliches Expressionsverhalten

zwischen den beiden Linien und keine direkte Reaktion auf die Intensität der Nitratzufuhr festgestellt.

Auch bei *RTCS1* blieb das Expressionsverhalten über die verschiedenen Zeitpunkte und Nitratzugaben konstant. Nur bei 28 h und einer Nitratzufuhr von 4 mM zeigte SL für *RTCS1* einen höheren Expressionspegel gegenüber TH (Tabelle 3 und Abbildung 44 B). Beim Homolog *RTCL1* von *RTCS1* wurde ein deutlicher Unterschied zwischen den Linien TH und SL festgestellt. Die Genexpression von *RTCL1* war bei der Linie SL im Durchschnitt 8,3fach höher gegenüber der Linie TH. Eine direkte Beeinflussung von Nitrat auf die mRNA-Menge wurde für *RTCL1* nicht beobachtet (Tabelle 3 und Abbildung 44 A). Diese Beobachtungen bestätigen auch die Ergebnisse der Clusteranalyse (Abbildung 42). Dort befand sich *RTCL1* zusammen mit 1382 Genen im Cluster 15, welches Gene beinhaltet, die bei TH niedrig und bei SL hoch exprimiert sind (6.3.3.4).

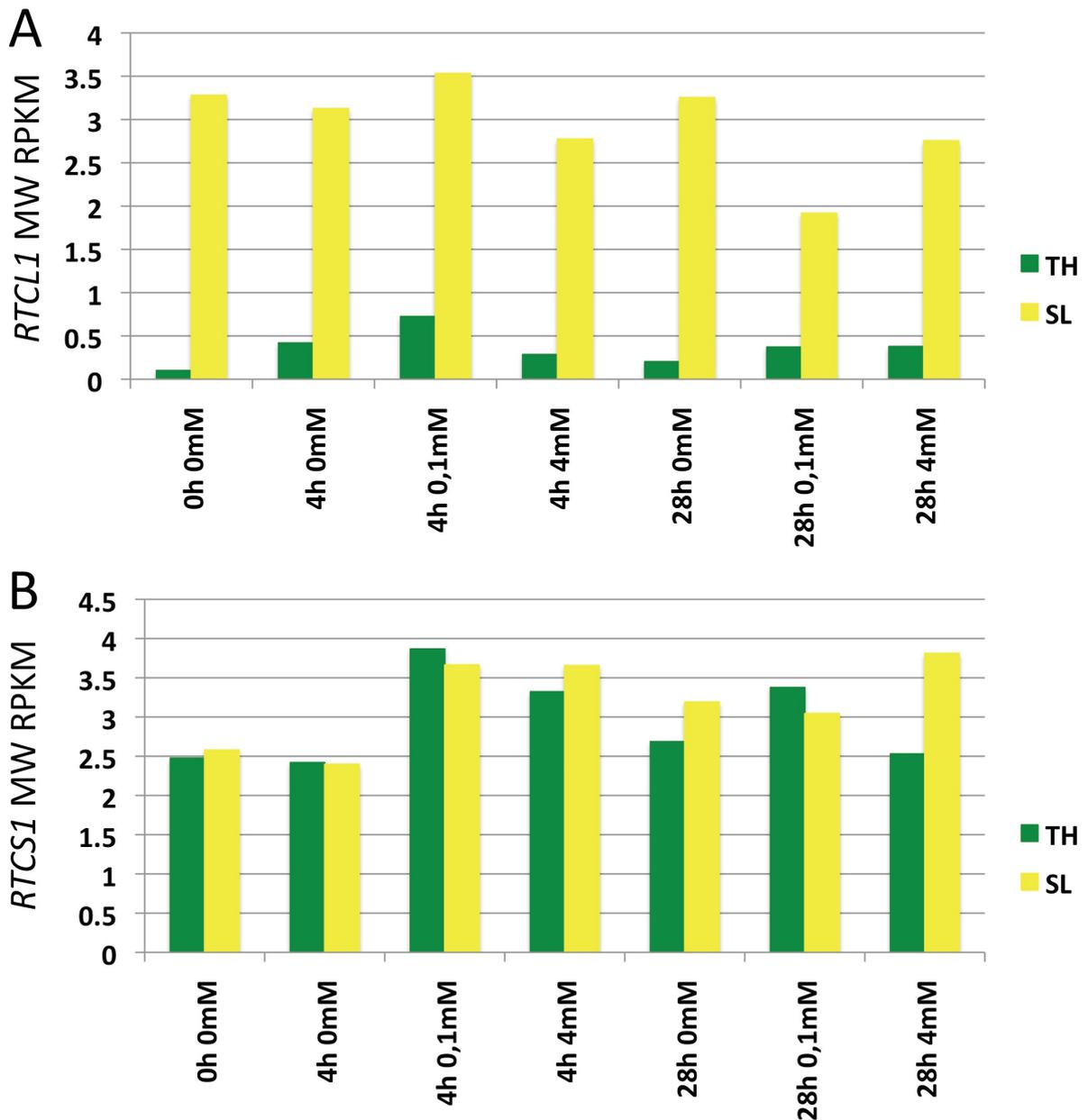


Abbildung 44 Mittelwerte der RPKM für *RTCL1* und *RTCS1* zu den verschiedenen Nitratstufen und Zeitpunkten

In den Säulendiagrammen sind die berechneten Mittelwerte der RPKM für die unterschiedlich aufgenommenen Zeitpunkte (0 h, 4 h und 28 h) bei den Nitratstufen 0 mM, 0,1 mM und 4 mM dargestellt. A zeigt dies für *RTCL1*, welches bei SL deutlich höhere Transkriptpegel zeigte, aber keine Abhängigkeit von der Nitratzufuhr. *RTCS1* zeigte ebenfalls keine Beeinflussung durch die Nitratzugaben oder den zeitlichen Verlauf. Nur 28 h nach der Zugabe von Nitrat konnte für SL eine höhere Transkriptanzahl gemessen werden. Zu den anderen Zeitpunkten sind die RPKM-Werte für beide Linien ähnlich.

7 Diskussion

Im Rahmen dieser Dissertation wurde die Interaktion von Stickstoffnutzeffizienz und Wurzelarchitektur bei Mais untersucht. Im Fokus der Untersuchungen standen die beiden Maislinien SL und TH, welche bei niedrigen Stickstoffbedingungen große Unterschiede in der Ertragsstabilität zeigen. SL zeigt auch unter Stickstoffmangel noch gute Erträge, die Erträge von TH brechen dagegen ein. In Rahmen vorangegangener Projekte wurden zwei bei niedriger Stickstoffzufuhr wirksame Ertrags-QTLs auf den Chromosomen 8 und 10 gefunden, die Teile der Effizienz genetisch erklärten. Beide Linien wurden hinsichtlich ihrer Wurzelarchitektur und der Reaktion auf Nitrat analysiert, da die Vermutung nahe lag, dass diese QTLs sich auch morphologischen äußern.

Es wurden Systeme für die Wurzelanalyse unter kontrollierten Bedingungen etabliert und die Linien unter Feldbedingungen bonitiert. Für den QTL 10 konnte ein Phänotyp gefunden werden, der die bessere Ertragsleistung der Linie SL unter niedrigen Stickstoffbedingungen erklären könnte. Die gefunden Unterschiede im Austrittswinkel der Kronwurzeln wurden anhand von drei Wochen alten Maispflanzen durch verschiedene NILs näher kartiert. Für den QTL 8 war eine Kartierung der vermutlich höheren Lateralwurzeldichte der Linie SL nicht möglich.

Es wurden große Unterschiede bei der Reaktion auf äußere Stickstoffbedingungen insbesondere bezüglich der Lateralwurzelbildung festgestellt. Dagegen waren die Unterschiede der beiden Maislinien bezüglich ihres Stickstoffstatus nur geringfügig. Weitergehend wurde die Erfassung der Gesamtoberfläche von Maiswurzelsystemen über ihre elektrische Kapazität versucht.

Desweiteren wurde die Reaktion der Transkriptome in den Wurzelsystemen der Linien SL und TH bei verschiedenen Stickstoffzufuhren im zeitlichen Verlauf analysiert. Neben globalen Analysen wurden denkbare Kandidatengene für eine bessere Stickstoffnutzeffizienz näher analysiert. Hier standen neben Nitrattransportern auch Gene für die Wurzelentwicklung im Mittelpunkt.

7.1 Zwei Chromosomenbereiche beim Ertrags-QTL 10 beeinflussen die Kronwurzelarchitektur

Der im Rahmen der Feldversuche beobachtete Phänotyp der Stützwurzeln (6.2.1) konnte auch im Gewächshaus durch Topfversuche für die Kronwurzeln reproduziert und vermessen werden. Der deutliche Unterschied in der Steilheit der Kronwurzelaustrittswinkel konnte für die Elternlinien sowie die daraus entwickelten NILs nachgewiesen werden (6.2.4). Die Ergebnisse der Feinkartierung (6.2.5) sind nicht eindeutig. Betrachtet man die Resultate der Feinkartierung, kommt man zu dem Schluss, dass es Gene an beiden äußeren Rändern des alten QTLs 10 geben muss, die Einfluss auf die Kronwurzelaustrittswinkel ausüben. SL und Linien mit Introgression aus diesen Bereichen weisen messbar flachere Winkel auf. Damit ist es sehr wahrscheinlich, dass die flacheren Kronwurzelaustrittswinkel eine phänotypische Erklärung für die bessere Stickstoffnutzeffizienz dieser Linie sind. Dies bestätigen auch Daten der Kornertragstests bei zwei verschiedenen Nitratstufen der Linien SL-N10-1 und SL-N10-2 sowohl auf Linienniveau als auch auf dem Niveau von Testkreuzungen (KWS SAAT SE, unveröffentlicht).

Neben den selbständig erhobenen Daten zeigte auch eine QTL-Kartierung von Kronwurzelwinkeln mit Teilen der DH-Population der beiden Elternlinien einen Effekt des Chromosoms 10 auf die Austrittswinkel der Kronwurzeln. Im Rahmen dieser Analyse konnte auch die Beobachtung bestätigt werden, dass es nahe dem alten Kornertrags-QTL zwei Bereiche gibt, welche Austrittswinkel der Kronwurzeln beeinflussen. Die QTL-Kartierung der Kronwurzelwinkel zeigte zwei fast überlappende QTLs für diesen Bereich (Pestsova, unveröffentlicht).

Auch die auf artfremdem Pflanzenmaterial basierenden Ergebnisse erhärten den Verdacht, dass sich auf dem Chromosom 10 ein Gen oder vielleicht mehrere Gene befinden, welche die Austrittswinkel von Kronwurzeln bei Mais stark beeinflussen können. Die QTL-Kartierung von Kronwurzelwinkeln innerhalb einer F₂-Population aus einer Kreuzung von *Zea mays* B73 und *Zea luxurians* zeigte mehrere wirkungsstarke QTLs für Wurzelwinkel bei *Zea* auf. Auch auf dem Chromosom 10 wurde von Omori and Mano, 2007 ein QTL gefunden, welcher sich mit dem im Rahmen dieser Arbeit

analysierten Ertrags-QTL auf Chromosom 10 überschneidet (Omori F. , 2007). Diese Erkenntnisse aus der Literatur untermauern das Ergebnis der Phänotypisierung.

Dadurch, dass wahrscheinlich zwei direkt nebeneinander liegende QTLs Einfluss auf die Austrittswinkel der Kronwurzeln nehmen, spaltet sich der messbare Effekt weiter auf. Dies könnte eine weitere Feinkartierung des Phänotyps erschweren, da der Unterschied der Austrittswinkel der NILs gegenüber dem rekurrenten Elter TH zwischen 8 und 18° liegt (siehe 6.2). Teilt sich dieser an sich schon geringe aber bisher stabile Unterschied weiter auf, hängt ein weiterer Feinkartierungserfolg von der Stabilität des Unterschiedes und damit der Reproduzierbarkeit der jeweiligen Effekte ab. Aufgrund der Daten der Neuberechnung des QTLs 10 (siehe 6.2.5 und 4.7.2) wurde der Verdacht erhärtet, dass nur der Genbereich zwischen Marker 39 und Marker 42 eine Wirkung auf die Kronwurzelwinkel und den Ertrag zu haben scheint. Der zweite festgestellte Genbereich in der Region zwischen Marker 8 und Marker 9 besitzt nach den derzeitigen Ergebnissen nur einen Einfluss auf die Kronwurzelaustrittswinkel. Erste weiterführende Experimente mit NILs für diese Genbereiche unterstützen diese Aussage (Daten nicht gezeigt).

Auch für *Oryza sativa* konnte ein QTL gefunden werden, der die Austrittswinkel der Wurzeln beeinflusst (Uga et al., 2011). Der QTL *Dro1* (*Deeper rooting1*) zeigte bei Reis eine Kontrolle über den Anteil der postembryonalen Wurzeln und deren Austrittswinkel, da diese verstärkt vertikal wachsen. Ziel der Analysen war es, einen QTL für Trockenstress bei Reis zu finden (Uga et al., 2011). In weiteren Analysen konnte das entsprechende Gen kloniert und gezielt in ursprünglich flachwurzelnende Genotypen eingekreuzt werden, wo es ebenfalls steilere und tiefere Wurzeln bewirkte. Gene, die in Reis einen ähnlichen Phänotyp wie *CRL1* (*Crown Rootless1*) erzeugen, zeigen eine andere Regulation, weshalb *DRO1* einer völlig neuen Genfamilie zuzuordnen ist (Uga et al., 2013). Die Tatsache, dass es auch in einer verwandten *Poaceae* mit einem vergleichbaren Wurzelsystem vergleichbare Beobachtungen gibt, festigen die gemachten Ergebnisse in Mais.

7.1.1 Flachere Austrittswinkel der Kronwurzel sorgen entgegen der gängigen Meinung für eine stickstoffnutzeffizientere Wurzelarchitektur

Betrachtet man die Ergebnisse und Überlegungen für stickstoffnutzeffiziente Wurzelsysteme, so zeichnet die Literatur das Bild eines Idealtypus mit sehr steilen, billigen und tiefen Wurzeln, ganz ähnlich dem für erhöhte Trockentoleranz (Bishopp and Lynch, 2015; Lynch, 2013; Pestsova et al., 2016; Postma and Lynch, 2011; Trachsel et al., 2013). Diese gängige Meinung widerspricht zunächst fundamental den gefundenen Ergebnissen des Phänotyps mit flacheren Austrittswinkeln für den QTL 10. Der für mehr Kornertrag bei niedriger Stickstoffzufuhr sorgende QTL ist mit dem Phänotyp der flachen Austrittswinkel eng assoziiert (siehe Kapitel 6.2). Warum aber zeigt die Linie mit den flacheren Wurzelaustrittswinkeln die höchste Stickstoffnutzeffizienz? Die Abbildung 45 gibt ein mögliches Gedankenspiel wieder. Gezeigt sind zwei Maispflanzen mit unterschiedlich steilen Kronwurzelwinkeln und den daraus resultierenden unterschiedlichen Bodenerschließungsmöglichkeiten. Die Pflanze A weist die Wurzelarchitektur der Linie SL, die Pflanze B die der Linie TH auf. Folgt man der gängigen Meinung der Literatur, sollte TH die Linie sein, welche effektiver an Stickstoffmangel angepasst ist (Bishopp and Lynch, 2015; Lynch, 2013; Pestsova et al., 2016; Postma and Lynch, 2011; Trachsel et al., 2013). Das Gedankenexperiment deckt jedoch einen fundamentalen Nachteil der von Lynch dogmatisch geforderten Steilheit der Kronwurzeln für Nitratreffizienz auf (Lynch, 2013): Bei Genotypen, deren Wurzeln streng senkrecht in die Tiefe wachsen, werden zwar schneller tiefere und damit potentiell nitrathaltige Bodenschichten erschlossen, gleichzeitig nimmt dadurch aber auch das erschließbare Erdvolumen ab. Befindet sich die Pflanze B in einem Umfeld mit nicht gleichmäßiger Nitratverteilung, wie es bei natürlichen Bodenverhältnissen der Fall ist, kann es im schlechtesten denkbaren Fall passieren, dass die Pflanze unter sich gar kein Nitrat vorfindet. In diesem Fall haben Pflanzen mit einem breiter aufgestellten Wurzelsystem wie die Pflanze A und damit auch die Linie SL größere Chancen Quadranten mit Nährstoffen zu erschließen. Da der Kornertrags-QTL und der beobachtete Kronwurzelphänotyp im Zusammenhang zu stehen scheinen, muss aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit zu den von Lynch genannten Merkmalen „steil, tief und billig“ (Lynch, 2013) das Merkmal „steil“ durch das Merkmal der gleichmäßigen Verteilung ersetzt werden. So sollte eine Maislinie mit möglichst langen und

aerenchymhaltigen Kronwurzeln dann besonders stickstoffeffizient den Boden erschließen, wenn sie ihre Kron- und Stützwurzeln durch flache Austrittswinkel breiter verteilen.

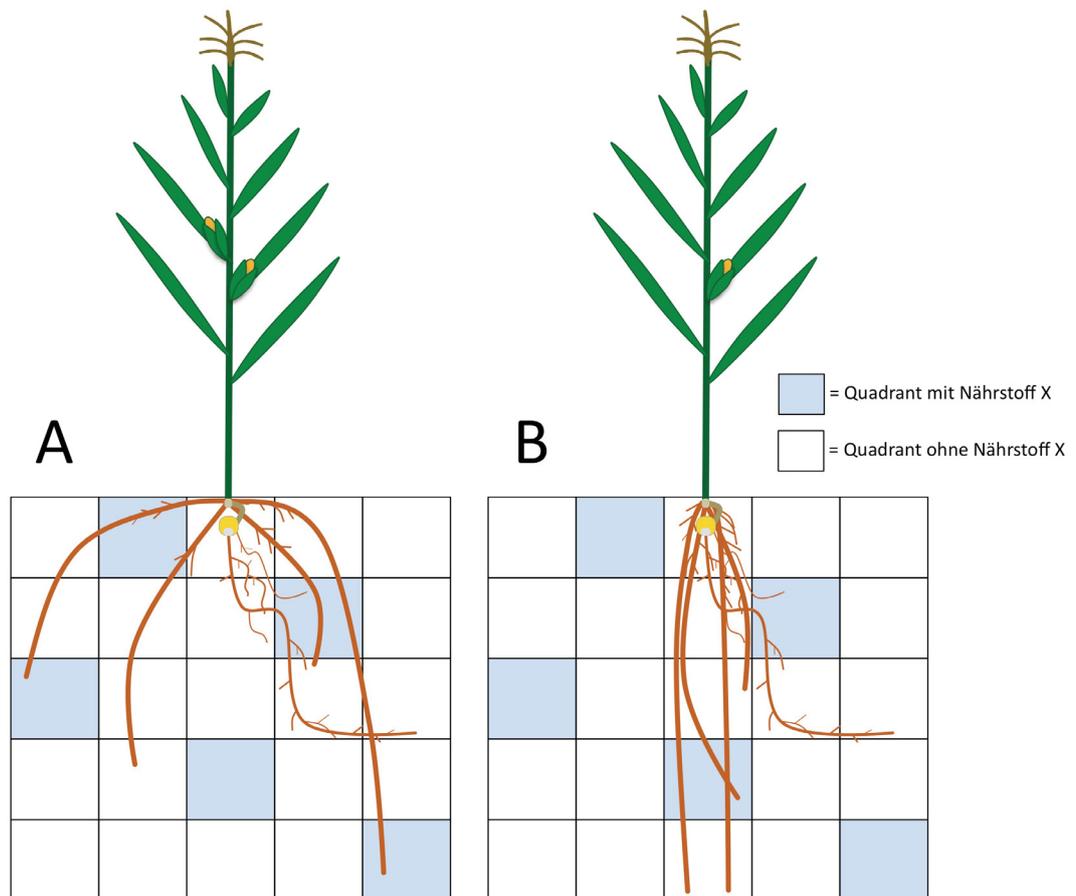


Abbildung 45. Gedankenexperiment zur Bodenerschließung mit verschieden steilen Wurzelaustrittswinkeln. Das Schema zeigt zwei Maispflanzen mit unterschiedlich steilen Kronwurzelaustrittswinkeln in einer denkbaren Erdmatrix. Die Erdmatrix ist in Quadranten unterteilt. Innerhalb der Quadranten gibt es welche mit dem fiktiven Nährstoff X (blau) und welche ohne diesen Nährstoff X (weiß). Diese ungleichmäßige Verteilung im Raum gibt die ebenso ungleichmäßige natürliche Situation des Bodens wieder. Die Pflanze A besitzt Kronwurzeln mit flacheren Austrittswinkeln als die Pflanze B. Die Pflanze B erreicht durch die steilen Wurzeln nur einen der 5 möglichen horizontalen Quadrantenblöcke mit dem Nährstoff X, die Pflanze A dagegen 4 von 5 dieser Quadrantenblöcke. Insgesamt erschließt die Pflanze A 14 Quadranten, die Pflanze B nur 5 Quadranten mit ihren Kronwurzeln.

7.1.2 Der Unterschied der Lateralwurzelichte von Primärwurzeln ist zwischen den Elternlinien bei niedrigen Stickstoffbedingungen groß

Zwischen den Elternlinien SL und TH konnte bei niedriger Stickstoffzufuhr für die Primärwurzel eine stärkere Lateralwurzelentwicklung festgestellt werden. Dieses Ergebnis war sowohl für Sämlinge in Keimrollenkultur (6.2.7) als auch für etwas ältere Pflanzen in Sand (6.2.8) konstant. Aufgrund der Ergebnisse vorhergegangener Arbeiten wurde versucht, auch diesen Phänotyp für aus TH entwickelten NILs mit Introgression von SL in der Region um QTL 8 zu kartieren. Dieses Merkmal erwies sich allerdings in zahlreichen Versuchen als nicht konstant. Dies galt ebenso für die Sämlinge wie auch für ältere Pflanzen. SL und TH zeigten bei niedriger Nitratkonzentration im Nährmedium stetig Unterschiede bezüglich der Lateralwurzelarchitektur. Es gab gute Gründe zu vermuten, dass mehr Lateralwurzeln einen leichten Stickstoffmangel unter Feldbedingungen ausgleichen können, da die dünneren Lateralwurzeln der Forderung nach kostengünstiger Wurzelarchitektur (Lynch, 2013; Zhu and Lynch, 2004) ohne weiteres nachkommen. Zusätzlich erfüllte das Merkmal auch die Vorgaben der Simulationen, die vor allem Vorteile für längere Lateralwurzeln sahen (Postma et al., 2014).

Ein Grund für das Misslingen dieser Kartierung war sicherlich der noch große Einfluss des Korns auf die Entwicklung der Maissämlinge und damit die große Abhängigkeit von der Saatgutqualität. Hinzu kam, dass die Lage des QTLs 8 nach der erneuten Kalkulation mit 622 statt 188 genetischen Markern korrigiert wurde. Dies hatte zur Folge, dass alle analysierten Linien maximal kleine oder gar keine Teile des QTLs 8 beinhalteten. Vielleicht ist der Effekt aber auch schwer kartierbar, da er sich selbst aus vielen genetischen Einzelfaktoren zusammensetzt.

7.2 Die Interaktion von Genotyp und äußerer Stickstoffbedingung sind bei den Elternlinien stark unterschiedlich – SL zeigt keine Reaktion auf steigende Stickstoffbedingungen

Es wurde die Reaktion von steigenden äußeren Nitratkonzentrationen auf die Lateralwurzelentwicklung der Primärwurzel der Elternlinien analysiert. Dabei konnte gezeigt werden, dass SL unabhängig von den äußeren Nitratkonzentrationen hohe Lateralwurzellängen aufweist. TH reagiert erst bei hohen Nitratgehalten von 10 mM mit einem verstärkten Wachstum von Lateralwurzeln. Eine hohe Lateralwurzellänge gilt als vorteilhaft bei Stickstoffmangel (Lynch, 2013; Postma et al., 2014). Auch die Initiation von Seitenwurzeln durch Nitrat und die Wirkung von Nitrat als Botenstoff sind hinreichend bekannt (Crawford, 1995; Patterson et al., 2016), auch bei Mais (Yu et al., 2015; Yu et al., 2014). Die stickstoffeffiziente Line SL bildet konstitutiv ein längeres Lateralwurzelsystem aus, was ihr die Erschließung größerer Erdvolumen ermöglicht (Postma et al., 2014). Unabhängig von den edaphischen Bedingungen sollte SL so in der Lage sein, größere Mengen Nitrat zu akkumulieren und Erdbereiche zu erschließen, wo potentiell Nitrat zur Verfügung steht. Damit ist SL besonders gut an stickstoffärmere Standorte angepasst, da sie unabhängig von der Nitratzufuhr ein voluminöseres Wurzelsystem ausbildet. Dagegen zeigt TH erst dann eine verstärkte Bereitschaft, mehr Lateralwurzeln auszubilden, wenn viel Nitrat im Boden vorhanden ist. In einem stickstoffarmen Boden kann ihr dieses Verhalten aber zum Verhängnis werden: ohne einen äußeren Reiz bildet TH nur eine schwach verzweigte Wurzelarchitektur aus und erschließt so ein geringeres Erdvolumen und verspielt so die Chance auf die Erschließung weiterer Stickstoffquellen.

7.2.1 Der Stickstoffstatus der Elternlinien SL und TH unterscheidet sich nur geringfügig

Die Bestimmung des Stickstoffstatus zeigte für die beiden Elternlinien nur geringfügige Unterschiede für die beiden untersuchten Gewebetypen. Die Berechnung des Stickstoffnutzeffizienz-Index auf Grundlage der Trockenmasse der analysierten Proben erbrachte für das Sprossgewebe nur geringe Unterschiede und damit einen minimal

besseren Stickstoffnutzeffizienz-Index bei der Linie TH. Die Ergebnisse des Wurzelgewebes bestärkten diesen Trend und lieferten einen konstant höheren Effizienz-Index für TH.

Damit konnte zwar ein Unterschied zwischen den Linien ausgemacht werden, dieser fiel allerdings sehr gering aus. Ein Grund dafür könnte das noch junge Stadium der Pflanzen sein. Jungpflanzen unterliegen größeren Schwankungen im Allgemeinen, aber auch bezüglich der Frisch- und Trockenmasse im Besonderen. Da die Bestimmung des Stickstoffnutzeffizienz-Index mit der Masse auch einen stark entwicklungsabhängigen Parameter mit einbezieht, haben die starken Schwankungen im juvenilen Stadium einen großen Einfluss auf die Berechnung. Durch die langsamere Entwicklung von SL kommt es zu einer Verzerrung, weil die Berechnung des Stickstoffnutzeffizienz-Index Pflanzen mit mehr Biomasse bei gleichzeitig geringem Nitratgehalt besser bewertet (Good et al., 2004). Da TH grundsätzlich eine schnellere Jugendentwicklung zeigte und gleichzeitig weniger Nitrat aufnahm, resultierte dies in einem besseren Stickstoffnutzeffizienz-Index. Eine Probenentnahme zu einem späteren Zeitpunkt könnte diesen Effekt vielleicht nivellieren. Die auf dem Feld beobachtete stärkere Stickstoffnutzeffizienz von SL konnte in der Hydrokultur bezüglich des prozentualen Stickstoffgehaltes bestätigt werden, allerdings ist aufgrund des geringen Unterschiedes diese Herangehensweise nicht geeignet, um beispielsweise NILs der beiden Elternlinien bezüglich ihrer Stickstoffnutzeffizienz zu vergleichen. Das frühe Entwicklungsstadium der analysierten Pflanzen erklärt vielleicht auch, warum sich die Ergebnisse der Pflanzen, die bei 0,0 mM oder 0,1 mM aufwachsen, so sehr ähnelten. Es ist möglich, dass immer noch Saatguteffekte einen großen Einfluss auf das Experiment ausübten. So wäre es auch möglich, dass schon die Samen von SL mehr Stickstoff enthielten und dies den geringfügig höheren prozentualen Anteil an Stickstoff bedingt hat. Dass Pflanzen Proteine oder auch Stickstoff in Samen einlagern, ist bekannt (Chopin et al., 2007; Sabelli and Larkins, 2009).

7.2.2 Die Messung der elektrischen Kapazität von Wurzelsystemen ist eine *in-situ*-Methodik mit nur bedingt reproduzierbaren Ergebnissen für die analysierten Maislinien

Im Rahmen dieser Dissertation wurde die Messung der elektrischen Kapazität als eine *in-situ*-Methode für das Feld erprobt. Es sollte die Reproduzierbarkeit für die zu analysierenden Maislinien getestet werden. Ein Vergleich mit in Gefäßkultur gezogenen Pflanzen sollte die Präzision der Methode für die verwendeten Linien verifizieren und die Frage klären, ob aufgrund der elektrischen Kapazität auch Rückschlüsse auf die Wurzelarchitektur geschlossen werden können.

Die Ergebnisse im Kapitel 6.1.3 zeigen die im August 2010 und 2012 auf dem Versuchsfeld in Grucking erhobenen Daten. Im Datensatz der Ergebnisse für das Jahr 2010 unterscheiden sich die Elternlinien TH und SL bezüglich der gemessenen nF-Werte signifikant voneinander. Dieses Ergebnis lässt sich bei den Messungen im Jahr 2012 nicht reproduzieren. Obwohl die Bedingungen vor und während der Messung zu beiden Versuchszeitpunkten vergleichbar waren, kamen beide Experimente zu unterschiedlichen Ergebnissen. Allerdings gilt es zu bedenken, dass sehr viele Faktoren Einfluss auf die Messung unter Feldbedingungen nehmen können:

Diese großen Schwankungen sind schwer zu erklären. Neben der Möglichkeit, dass die Pflanzen Unterschiede in ihren Wurzelsystemen aufgrund der verschiedenen Witterungseinflüsse der Jahre 2010 und 2012 ausbildeten, spielt bei dieser Methode die Sättigung des Bodens mit Wasser eine essentielle Rolle. Dies zeigte auch Dietrich in Versuchsreihen an *Hordeum vulgare* L., der bei steigendem Wassergehalt des Substrates gleichfalls steigende elektrische Kapazitäten der Wurzel messen konnte (Dietrich, 2013). Vergleichbare Sättigungswerte im Feldversuch ließen sich nur durch künstliche Wassergaben erreichen, was diese an für sich simple Methode wiederum aufwendiger macht. Steht in der Nähe des Versuchsfeldes eine Bewässerungsquelle zur Verfügung, ist die Erfassung der elektrischen Kapazität von Wurzelsystemen vielleicht eine Möglichkeit, um Genotypen auf ihre Wurzeloberfläche hin zu analysieren. Die Ergebnisse aus 6.1.4 zeigen gleiche Tendenzen für beide bestimmten Eigenschaften.

Allerdings wird auch gezeigt, dass eine ähnlich große Oberfläche von Wurzelsystemen auf sehr unterschiedliche Art und Weise durch die beiden Elternlinien erreicht werden

kann. Da die Messung der elektrischen Kapazität von Wurzelsystemen nicht zwischen Lateralwurzeln und weiteren Wurzeltypen zu unterscheiden vermag, ist mit ihr eine Unterscheidung von Wurzelsystemen mit unterschiedlichen Wurzelstrategien nicht möglich. Damit scheidet die Methode zur Phänotypsierung der Maislinien SL und TH sowie der aus diesen entwickelten NILs aus.

7.3 Vergleichende Analyse der RNS-Pegel der unterschiedlich effizient Stickstoff nutzenden Maislinien SL und TH

Die unter 6.3.3 gemachten Ergebnisse bestätigen die unter 6.3.1 gemachten Beobachtungen. Die Linie TH zeigte auch bei den Transkriptomveränderungen eine global gesehen stärkere Reaktion auf Nitrat als die Linie SL. Es scheint als ließe die Linie SL sich weniger stark durch steigende Nitratkonzentrationen im Nährmedium und damit sichleich auch auf dem Feld beeinflussen. Auffällig ist die Beobachtung, dass bei TH die kurzfristige Reaktion auf Nitrat deutlich positiver ausfällt als bei SL. Dies deckt sich mit den bei den Nitrattransportern gemachten Beobachtungen (6.3.3.5). Zusätzlich erklärt diese Beobachtung auch die vermeintlich bessere Stickstoffnutzeffizienz von TH in 6.3.2, TH reagiert auf Stickstoff schneller und nutzt dessen Verfügbarkeit somit auch zeitnaher aus. Dies führt zu einer schnelleren Entwicklung der Linie TH. Längerfristig gesehen zeigte bei der separaten Analyse der Linien SL aber eine stärker positive Hochregulation von Genen durch Nitrat. Dieses Verhalten passt zu den auf dem Feld gemachten Beobachtungen, wo SL auch erst spät in der Wachstumsphase seine bessere Stickstoffnutzeffizienz offenbart. Aus der Literatur ist bekannt, dass viele mit dem Stickstoffstoffwechsel assoziierte Gene, wie beispielsweise die Nitratreduktase, nach 4 h schon eine eindeutig positive Reaktion zeigen (Trevisan et al., 2011). Dies bestätigt die beobachtete schnelle Reaktion von TH schon 4 h nach der ersten Nitratzufuhr. Auch in *Arabidopsis* ist für beide dort bekannten Nitratreduktasegene eine schnelle und langfristige Reaktion sowohl bei hoher als auch bei niedriger Nitratzufuhr bekannt (Wang et al., 2000). Dies spricht für die gewählten Versuchsparmeter.

Die vergleichende Analyse des Transkriptomverhaltens der unterschiedlich effizient stickstoffnutzenden Elternlinien SL und TH konnte keine grundsätzlichen Unterschiede aufzeigen. Entweder zeigten die Elterlinien ein konstant unterschiedlich Verhalten ohne

eine Reaktion auf Nitrat oder die transkriptomale Reaktion war bei beiden Linien in den durchgeführten Analysen gleichartig. Dadurch, dass keine grundsätzlich verschiedenen genomweiten Reaktionen der Gentranskription der Linien festgestellt wurden zeigt, dass die Unterschiede in der Stickstoffnutzeffizienz konstitutiver Natur sind. Dies bestätigt wiederum die tragende Rolle des nitratunabhängig sichtbaren Phänotyps der flacheren Kronwurzelwinkel (6.2) und des diesen Phänotyp möglicherweise mitbestimmenden *RTCL1* (6.3.3.5). Das Transkript von *RTCL1* befindet sich in einem Cluster welches ein grundsätzlich verschiedenes Transkriptomverhalten von TH und SL zeigte. Es ist davon auszugehen, dass sich in solchen Clustern noch weitere Gene finden lassen, die für die konstitutiv unterschiedliche Stickstoffnutzeffizienz von TH und SL verantwortlich sind.

7.3.1 Die effizienter Stickstoff nutzende Linie SL zeigt keine erhöhten Transkriptpegel für die in Mais bekannten Nitrattransportergene

Eine Analyse der transkriptionellen Reaktion der bei Mais bekannten Nitrattransporter zeigte für die beiden unterschiedlich stickstoffnutzeffizienten Elternlinien größtenteils eine identische Reaktion auf die Nitratzugaben. Nur für *NRT4* konnte eine differentiell unterschiedliche Reaktion der Eltern gefunden werden (siehe Abbildung 43), welche sich in höheren Transkriptpegeln für die ineffiziente Linie TH äußert. Allerdings sind die RPKM-Werte von *NRT4* auf äußerst gering Niveau, so dass die Aussagekraft dieses Ergebnisses sehr gering ist. *NRT4* ist ein auf Basis der bekannten Transportersequenzen der Maislinie B73 vorhergesagtes Gen, welches *in vivo* bisher nicht näher untersucht wurde. Ein Vergleich der entsprechenden cDNS-Sequenz deckte eine große Ähnlichkeit mit anderen hochaffinen Nitrattransportern auf, was die stärkere Expression bei keiner (0 mM) oder niedriger (0,1 mM) Nitratzugabe erklären würde.

Dass generell wenige Unterschiede der transkriptionellen Reaktion auf Nitrat zwischen den beiden unterschiedlich effizienten Linien gefunden wurden, mag zum einen an der großen genetischen Ähnlichkeit des von der KWS Saat SE gestellten Materials liegen. Der genomweite Vergleich der Reaktion der Transkriptome zeigte schließlich für beide Linien bei den meisten Genen ein ähnliches Verhalten. In Anbetracht aller durchgeführten Analysen scheint es am wahrscheinlichsten, dass die Vorteile der Linie

SL bei Stickstoffmangel auf morphologische Unterschiede zurückzuführen sind. Die Analysen der Transkriptpegel der potentiellen Kandidatengene zeigten zumindest keine höhere Expression. Allerdings gilt es zu bedenken, dass auch eine höhere Genexpression nicht zwingend zu mehr Genprodukt führen muss, da viele posttranskriptionelle Faktoren gleichfalls eine Rolle spielen können.

7.3.2 Das für die Kron- und Seminalwurzelarchitektur von Mais relevante Gen *RTCL1* zeigt konstant höhere RNS-Pegel beim Elter SL

Für die beiden unterschiedlich stickstoffnutzeffizienten Maislinien SL und TH konnten weitreichende morphologische Unterschiede in der Wurzelarchitektur gefunden werden. Insbesondere die Unterschiede bezüglich der Austrittswinkel der Kronwurzeln zeigten sich als konsistentes Merkmal zwischen beiden Linien und korrelierten mit einem der berechneten Kornertrag-QTLs bei Stickstoffmangelbedingungen. Die Analyse der in Mais bekannten die Wurzelentwicklung kontrollierenden Gene ergab für das im Bereich von QTL 8 liegende *RUL1*-Gen bei SL konstant höhere mRNS-Level (Tabelle 3). Der Unterschied gegenüber TH ist allerdings moderat. Dies gilt für ebenfalls für *RTCS1*. Eine Ausnahme stellt dagegen das Ergebnis für *RTCL1* dar: Dieses Homolog von *RTCS1* zeigt für die Linie TH sehr niedrige Transkriptpegel, für die Linie SL hingegen im Durchschnitt 8,3fach höhere RPKMs. Die für Gene relativ niedrigen mRNS-Pegel mit einem RPKM von maximal 3,8 für *RTCS1* und maximal 3,6 für *RTCL1* decken sich mit den Ergebnissen von Taramino et al. (2007). Entgegen der von Taramino et al. (2007) aufgestellten These der nur kurzzeitigen Expression, konnten für *RTCS1* allerdings zu allen gewählten Zeitpunkten Transkripte festgestellt werden. Auch war der Unterschied der Expressionsstärke von *RTCL1* im Verhältnis zu *RTCS1* bei der Linie SL gering und teilweise sogar gleich oder höher, was den von Taramino et al. (2007) gemachten Beobachtungen widerspricht. Nur bei der Linie TH überwiegen wie bei Taramino et al. (2007) die *RTCS1*-Transkriptmengen gegenüber denen von *RTCL1* (Taramino et al., 2007).

RTCS1 ist einer der wesentlichen Faktoren bei der Entwicklung von Seminal-, Kron- und Stützwurzeln. Es kann insbesondere im Wurzelgewebe und in Primordien des Coleoptilenknotens nachgewiesen werden. Dies gilt auch für das durch Genduplikation

entstandene *RTCL1*. Für beide Gene konnten Hinweise gefunden werden, dass sie durch Auxin induziert werden. *rtcs1*-Mutanten zeigten neben dem Fehlen der sprossbürtigen Wurzeln und Seminalwurzeln auch eine verringerte gravitropische Reaktion, was sich in Experimenten mit der Primärwurzel in flacheren Winkeln bei den Mutanten äußerte (Hetz, 1996; Taramino et al., 2007). Diese von Taramino et al. (2007) gemachte Beobachtung zeigt den Einfluss von *RTCS1* nicht nur auf die Ausbildung von Seminal-, Kron- und Stützwurzeln, sondern auch auf die Ausrichtung der vorhandenen Wurzeln.

RTCL1 zeigt bei B73 auf Proteinebene 72 % Ähnlichkeit zu *RTCS1*. Beide Proteine weisen eine sogenannte pflanzenspezifische LOB-Domäne (Lateral Organ Boundaries) auf (Majer et al., 2012; Taramino et al., 2007). Diese Domäne ist auch in anderen Pflanzenspezies bekannt (Inukai et al., 2005; Liu et al., 2005; Shuai et al., 2002) und besitzt ein konserviertes CX₂CX₆CX₃C-Motiv, welches denen der Leucin-Zipper ähnelt (Iwakawa et al., 2002). In *Arabidopsis* erfüllen Proteine der LBD-Familie (Lateral Organ Boundaries Domain) eine regulative Funktion in der Blattentwicklung und der Lateralwurzelbildung (Iwakawa et al., 2002; Shuai et al., 2002). Auch für *Oryza sativa* sind *RTCS1*-ähnliche Gene und Mutanten mit Defekten in diesen Genen bekannt. Das Gen *CRL1* (Crown Root Less1) sorgt in *Oryza sativa* für einen vergleichbaren Phänotyp (Inukai et al., 2005), ebenso wie *ARL1* (Adventitious Rootless1), dessen Mutanten keine Adventivwurzeln mehr ausbilden (Liu et al., 2005). Beide Gene weisen ebenfalls eine konservierte LOB-Domäne auf. Für *CRL1* ist bekannt, dass es in Reis als auxinabhängiger Transkriptionsfaktor die Aktivität weiterer Gene in Kronwurzelprimordien reguliert (Coudert et al., 2015). Dies bestätigt die von Taramino et al. (2007) gemachten Beobachtungen bei Mais und festigt für diese Spezies die essentielle Rolle von *RTCS1* bei der Kronwurzelausbildung. Dass es sich höchstwahrscheinlich bei *RTCS1* um einen Transkriptionsfaktor handelt, veranschaulichen Lokalisationsstudien in *Arabidopsis*-Protoplasten, welche eine Kernlokalisierung zeigten (Majer et al., 2012).

Für *RTCL1* konnten Majer et al. (2012) keine klare Lokalisation feststellen. Die Fusionsproteine von *RTCL1* befanden sich sowohl Kern als auch im Cytoplasma (Majer et al., 2012). Für *RTCL1* ist bisher weder die phänotypische Ausprägung noch die Funktion in Mais bekannt. Dies gilt auch für andere verwandte Spezies wie Reis, welche gar kein Paralog zum Homolog *CRL1* besitzen. Es wird vermutet, dass *RTCL1* und *RTCS1* miteinander interagieren (Majer et al., 2012; Taramino et al., 2007).

Es wäre denkbar, dass das höhere Verhältnis von *RTCL1* zu *RTCS1* in den Primärwurzeln der *rtcs1*-Mutanten zu der von Taramino et al. (2007) beobachteten schwächeren gravitropen Reaktion führt. Dies legt den Schluss nahe, dass die hohen *RTCL1*-Pegel – vorausgesetzt diese führen auch zu einer vermehrten Proteinbildung – in SL auch in den Kronwurzeln wirken und damit die flacheren Austrittswinkel durch eine abgeschwächte gravitrope Reaktion bedingen. Durch die von Majer et al. (2012) und Taramino et al. (2007) gemachten Beobachtungen lässt sich die Hypothese aufstellen, dass gerade das Verhältnis von *RTCL1* und *RTCS1* bedeutend für die Wirkung von *RTCL1* ist. In Kombination mit den eigenen Beobachtungen führt dies zu der Vermutung, dass eine erhöhte Menge an *RTCL1* gegenüber *RTCS1* in der Linie SL – vielleicht sogar bei Mais generell – zu einem flacheren Wurzelwachstum führt. Ob *RTCL1* wirklich eine essentielle Rolle bei der Wurzelarchitektur spielt, können aber erst weitere Experimente zeigen. Ein Ansatz wäre beispielsweise eine Überexpression von *RTCL1*, was zu flacheren Wurzelaustrittswinkeln gegenüber dem Wildtyp führen müsste, sollte die Hypothese zutreffen. Alternativ könnte man auch durch Tilling (Targeting Induced Local Lesions In Genomes) *RTCL1* mutieren und analysieren, ob die erzeugten Mutanten steilere Kronwurzelwinkel aufweisen. Auch eine gezielte Analyse der RNS-Pegel von *RTCL1* und *RTCS1* des Coleoptilenknotens und der Kronwurzeln würde weiterführende Erkenntnisse liefern als die durchgeführte globale Analyse der Wurzelsysteme.

RTCL1 wurde physikalisch bei der Linie B73 auf Chromosom 9 kartiert (Taramino et al., 2007). Damit liegt das Gen in keinem der Kornertrags-QTLs. Die Möglichkeit das *RTCL1* bei der Linie SL (und auch TH) auf Chromosom 10 in der QTL-Region liegt ist eher gering. Um dies einwandfrei zu klären, müsste *RTCL1* in SL genetisch kartiert werden. Ein weiterführender Schritt wäre zu überprüfen, ob die transkriptionelle Hochregulierung von *RTCL1* mit dem Vorhandensein des QTLs 10 korreliert. Dann läge eine aktivierende Funktion des QTLs 10 auf die *RTCL1*-Expression nahe. Dies führt zu dem Schluss, dass in der Genregion des QTLs 10 bei SL die Ursachen für eine Aktivierung von *RTCL1* auf Chromosom 9 liegen. Auch der umgekehrte Fall ist für die Linie TH denkbar, nämlich, dass hier im Bereich des QTLs 10 hemmende Faktoren für *RTCL1* liegen. Diese Kausalität könnte, mit der mRNS-Expressionsniveauanalyse von NILs welche den ganzen QTL 10 enthalten, überprüft werden.

8 Zusammenfassungen

8.1 Deutsche Zusammenfassung

Ein essentielles Zuchtziel des 21. Jahrhunderts bei Mais und anderen Feldfrüchten ist eine Verbesserung der Stickstoffnutzeffizienz. Um dieses Zuchtziel zu erreichen, ist es wichtig, die an der Stickstoffnutzeffizienz beteiligten Genomabschnitte zu identifizieren und die zugrundeliegenden Mechanismen zu verstehen. Die Analyse der hinsichtlich der Kornertragsdaten unterschiedlich stickstoffeffizienten Maislinien SL und TH hatte zum Ziel, die genetischen Gründe für die bessere Ertragsleistung der Linie SL bei niedriger Nitratzufuhr weiter aufzuklären.

Durch die genetische Analyse der Wurzelarchitektur sollte geklärt werden, ob die erhöhte Stickstoffnutzeffizienz auf Unterschiede zwischen den Wurzelsystemen zurückzuführen war und diese mit den zuvor berechneten, nur bei wenig Nitrat wirksamen Kornertrags-QTLs 8 und 10 korrelierten. Für den QTL 8 konnte der vermutete Zusammenhang zwischen mehr und längeren Lateralwurzeln und erhöhtem Ertrag mit dem vorhandenen NIL-Material nicht bestätigt werden, wohl aber die unterschiedliche Reaktion der Eltern auf Nitrat im Nährmedium. Die Stickstoff effizient nutzendere Linie SL zeigte in Bezug auf ihre Primärwurzel konstant einen höheren Anteil von Lateralwurzeln unabhängig von der Nitratzufuhr. Die Linie TH bildete nur bei hohen äußeren Nitratkonzentrationen längere Lateralwurzeln an ihrer Primärwurzel aus. Für den Kornertrags-QTL 10 konnte ein Phänotyp entdeckt werden, der bei SL und NILs mit den entsprechenden Introgressionen auf Chromosom 10 im Gewächshausversuch für flachere Kronwurzelaustrittswinkel sorgt. Dieser Phänotyp konnte auch im Rahmen von Feldversuchen bestätigt werden und zeigte sich unabhängig von der Nitratzufuhr. Eine Feinkartierung der flacheren Kronwurzelaustrittswinkel lokalisierte zwei Genregionen auf Chromosom 10, welche für die flacheren Austrittswinkel verantwortlich zu sein scheinen. Eine der beiden Genregionen deckt sich mit der Lage des Ertrags-QTLs und könnte deshalb höhere Erträge auch bei niedriger Nitratzufuhr auf dem Feld bewirken. Es liegt die Vermutung nahe, dass die flacheren Kronwurzelaustrittswinkel für eine verbesserte Wurzelarchitektur zur effektiveren Erschließung des Bodens sorgen.

Physiologische Untersuchungen ergaben für die Linie SL einen tendenziell höheren Gesamtstickstoffgehalt in Spross und Wurzeln. Durch die bessere und schnellere Entwicklung im Sämlingsalter bescheinigte die Berechnung des Stickstoffnutzindex aber für die Linie TH die bessere Nutzung von Stickstoff pro Gramm aufgebautes Gewebe. Mit Hilfe der Messung der elektrischen Kapazität der Wurzelsysteme der untersuchten Maislinien konnte die erwartete klare Korrelation von Wurzeloberfläche und elektrischer Kapazität verifiziert werden. Gleichzeitig wurde aber auch die schlechte Reproduzierbarkeit der Methode festgestellt sowie deren mangelnde Aussagekraft.

Die genomweiten Studien der Gentranskription in der Wurzel zeigten für beide Linien eine Reaktion auf Nitrat. Diese Reaktion fiel bei der Linie TH insgesamt stärker, aber auch kurzfristiger aus. SL wies dagegen für Nitrat eine kurzfristig gesehen weniger starke, jedoch eher langfristige Reaktion der genetischen Regulation auf. Dies deckt sich mit den zuvor gemachten physiologischen Beobachtungen. Im direkten Vergleich konnte eine Vielzahl von bei TH und SL differentiell exprimierten Genen festgestellt werden. Die transkriptionelle Reaktion der beiden Linien auf Nitrat war allerdings laut Cluster-Analyse stets identisch, wenn auch auf unterschiedlichem Niveau. Eine Untersuchung potentieller Kandidatengene wies signifikante Unterschiede zwischen SL und TH für *ROOTLESS CONCERNING CROWN AND SEMINAL ROOTS LIKE 1 (RTCL1)* auf. Dieses auf Chromosom 9 liegende Gen zeigte, unabhängig von der Nitratzufuhr, für die Linie SL eine wesentlich höhere Transkription als für die Linie TH. Aufgrund der Tatsache, dass die Primärwurzeln von *rtcl1*-Pflanzen einen verminderten Gravitropismus aufweisen, wäre es sinnvoll, dieses Gen bei den Linien SL und TH weiter zu untersuchen. Vielleicht spielt *RTCL1* ebenfalls eine Rolle bei dem Phänotyp der flacheren Kronwurzelaustrittswinkel, der für die Stickstoffeffizienz von SL anscheinend essentiell ist. Die erhöhten Transkriptpegel von *RTCL1* könnten dann auch eine Folge eines Gens oder Genregulators der QTL 10-Region vom stickstoffnutzeffizienteren Elter SL sein.

8.2 Englische Zusammenfassung

An essential aim of the plant breeding efforts in the 21st century are crop varieties with a higher nitrogen use efficiency, and that is especially important maize. The maize lines SL and TH show a different nitrogen use efficiency with respect to their grain yield. The objective was to find explanations for the higher grain yields of the line SL under low nitrogen-input conditions.

Based on the genetic analysis of the root architecture of both lines it could be shown that the higher nitrogen use efficiency arose, at least partly, from differences between the root systems. Additionally, it was examined whether these differences in root architecture correlate with the grain yield QTLs 8 and 10 only being effective under low nitrate-input conditions. With regard to QTL 8 the expected relation between longer and more lateral roots resulting in the higher yield was not confirmed. However, the lines SL and TH showed a different reaction on nitrate: the nitrogen-use-efficient SL exhibited a higher percentage of lateral roots for total primary root length independently of outer nitrate concentrations. In contrast, the line TH developed longer lateral roots but only under high outer nitrate conditions. A new phenotype was found correlating with the region of the grain yield QTL 10 independently of outer nitrate concentrations. This phenotype causes shallower exit angles of crown roots in the Line SL and NILs carrying introgressions of QTL 10. The phenotype could be detected both in greenhouse and field trials. The fine mapping of this trait resulted in to regions on chromosome 10 which seem to be responsible for the shallower exit angles of crown roots. One of these regions overlaps with the region of the grain yield QTL 10, and thus, it may cause higher yields under low nitrogen conditions. Therefore, it can be assumed that the shallower exit angles of crown roots improve the root architecture under low nitrogen conditions so that the soil can be exploited more effectively.

Physiological investigations have shown a higher nitrogen content in shoot and roots regarding the line SL. Due to faster development during the seedling stage in general the line TH exhibited an improved nitrogen usage index resulting in a better usage of nitrogen per gram plant tissue. Electrical root capacity measurements verified the presumed correlation of root surface and electrical capacity. Simultaneously, the poor reproducibility and validity of this method was pointed out.

Genome-wide studies of gene transcripton in roots indicated a response to nitrate for both maize lines. The reaction of the line TH was stronger but more of a short-term character. SL showed a weaker, but longer lasting reaction of its genetic regulation. This confirms the previously made results. In direct comparison of both lines lots of differentially expressed genes were found. An analysis of potential candidate genes revealed significant difference between SL and TH with respect to *ROOTLESS CONCERNING CROWN AND SEMINAL ROOTS LIKE 1 (RTCL1)*. This gene from chromosome 9 exhibited a higher nitrate-independent expression for the line SL. Primary roots of *rtcl1*-plants show a reduced gravitropism, so it makes sense to analyse this gene in SL and TH in more detail. Perhaps, *RTCL1* even plays a role in forming shallower exit angles of crown roots of SL and is possibly essential for its higher nitrogen use efficiency. The increased transcript levels then could be a consequence of a gene or gene regulator located within the QTL 10 region of SL.

9 Appendix

9.1 Berechnung der Stickstoffnutzeffizienz im Wurzelgewebe der beiden Elternlinien

Wie unter 6.3.2 beschrieben wurde der Stickstoffstatus der Elternlinien bestimmt. Die Ergebnisse der Berechnung für die Wurzelgewebe befinden sich in der Abbildung 46.

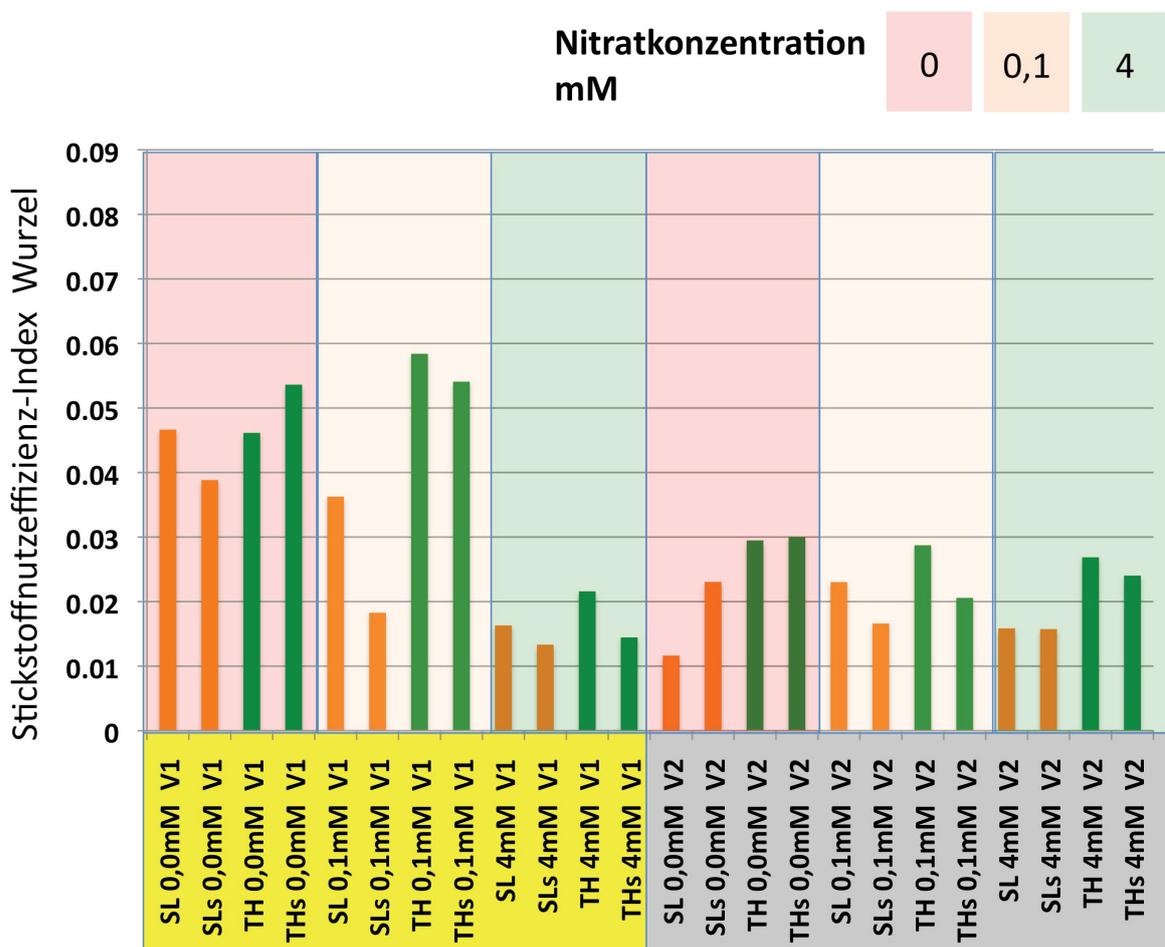
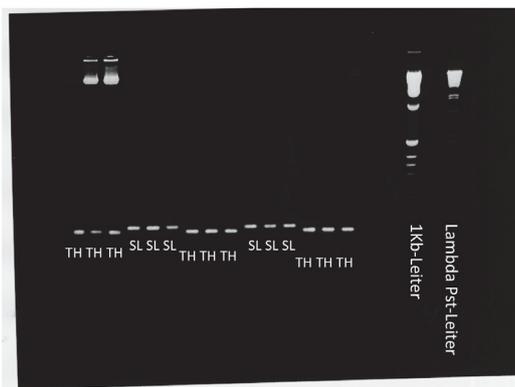
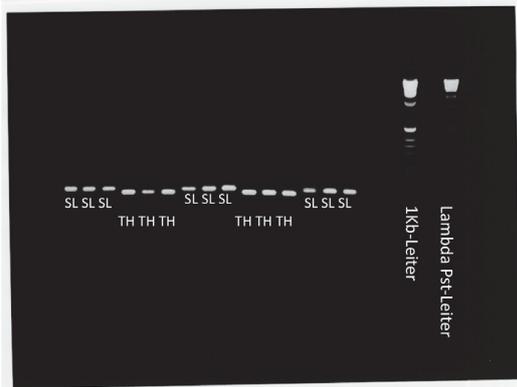


Abbildung 46. Berechneter Stickstoffnutzeffizienz-Index für das analysierte Wurzelmaterial.

Das Säulendiagramm zeigt den berechneten Stickstoffnutzeffizienz-Index für die analysierten Wurzelsysteme. Es wurden jeweils die biologisch unabhängigen Wiederholungen paarweise aufgetragen. Die jeweilige Wiederholung wurde mit einem „s“ markiert. Für beide Versuchsblöcke V1 und V2 erwies sich TH in allen Fällen als die tendenziell effizientere Linie. Besonders groß war der Unterschied bei einer Nitratkonzentration von 0,1 mM im Versuchsblock V1.

9.2 Verifizierung der genetischen Echtheit der in der Transkriptomsequenzierung verwendeten Elternlinien mittels SSR-Markern

Zur Kontrolle wurden die Linien deren Transkriptome sequenziert werden sollten auf die Korrektheit ihrer Genotypen hin analysiert. Dies geschah mit SSR-Markern. Es wurden Marker für die Chromosomen 4, 5, 8 und 10 verwendet. Im Rahmen dieser Dissertation werden aber aufgrund der Redundanz nur die Marker und deren Ergebnisse für die Chromosomen 8 und 10 gezeigt. Die Sequenzen der Marker sind im Kapitel 5.1.3 und die dazugehörigen Protokolle im Kapitel 5.6.6 zu finden. Die Ergebnisse der Genotypisierung der von den verwendeten Pflanzen isolierten genomischen DNS ist den Abbildung 47 und Abbildung 48 zu entnehmen. Dort ist zu erkennen, dass die SSR-Marker das jeweils erwartete Resultat zeigen. Dies war ebenfalls für die weiteren nicht gezeigten SSR-Marker der Fall. Man kann also davon ausgehen, dass die reinen Elternlinien für den Methoden in 5.6.3 verwendet wurden und es das Risiko von Saatgutverunreinigungen nahezu ausgeschlossen ist.



**Marker umc1336 für Chromosom 10
Oligonukleotide für S-
Adenosylmethionin Synthase 1**

**3 %tiges Agarosegel, Standard 1 kb
Leiter und Lambda Pst Leiter**

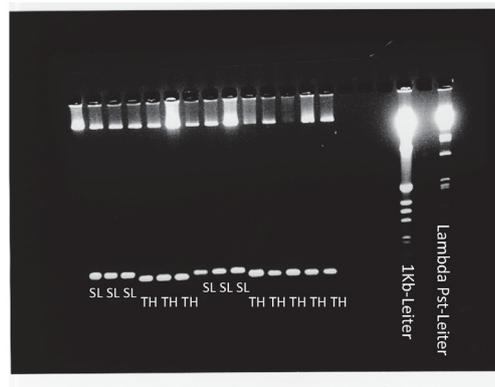
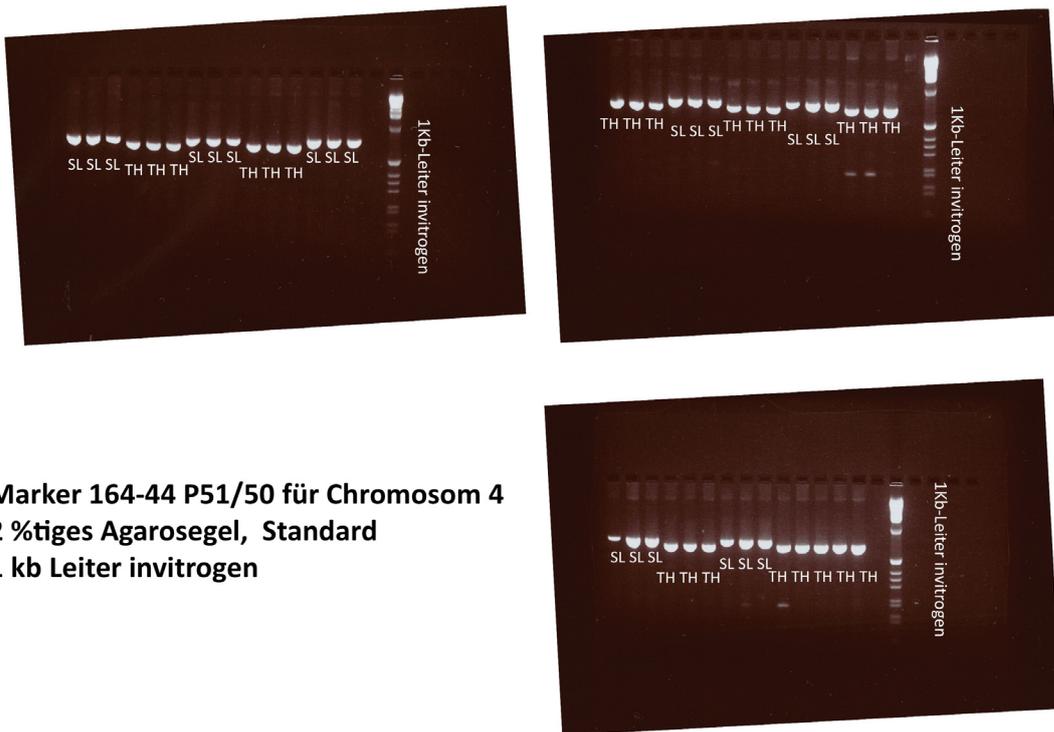


Abbildung 47 Ergebnisse der Genotypisierung der Elternlinien mit dem genetischen Marker umc1336
Die Abbildung zeigt die Gelbilder als Ergebnisse der Genotypisierung mit dem genetischen Marker umc1336 für 44 Proben genomischer DNS. Der Marker zeigt für alle SL-Proben einheitlich das erwartete kleinere PCR-Produkt. Dies gilt umgekehrt für die TH-Proben. Die Gelelektrophorese wurde auf einem 3%tigen Agarosegel durchgeführt. Als Standard wurde eine 1kb Leiter und eine Lambda Pst Leiter aufgetragen.



**Marker 164-44 P51/50 für Chromosom 4
2 %tiges Agarosegel, Standard
1 kb Leiter invitrogen**

Abbildung 48. Ergebnisse der Genotypisierung der Elternlinien mit dem genetischen Marker 164-44 P51/50. Die Abbildung zeigt die Gelbilder als Ergebnisse der Genotypisierung mit dem genetischen Marker 164-44 P51/50 für 44 Proben genomischer DNS. Der Marker zeigt für alle SL-Proben einheitlich das erwartete größere PCR-Produkt. Dies gilt umgekehrt für die TH-Proben. Die Gelelektrophorese wurde auf einem 2%tigen Agarosegel durchgeführt. Als Standard wurde eine 1kb Leiter aufgetragen.

9.3 Analyse der Vergleichbarkeit der einzelnen sequenzierten Transkriptome

Vor der eigentlichen Analyse der Transkriptom-Daten, wurden die einzelnen Proben auf ihre Vergleichbarkeit untereinander hin untersucht. Bei der Linie TH zeigte sich bei der PCA, dass alle jeweils drei biologisch unabhängigen genommen Proben, sich bei gleicher Nitratzufuhr ähnlicher waren, als gegenüber Proben bei einer unterschiedlichen Nitratzufuhr (siehe Abbildung 49 blauer, dunkelblauer, grüner und orangener Kasten). Wurden Proben von Pflanzen ohne Nitratzufuhr genommen, waren sich die Proben unabhängig vom Zeitpunkt ähnlich (Abbildung 49 roter Kasten).

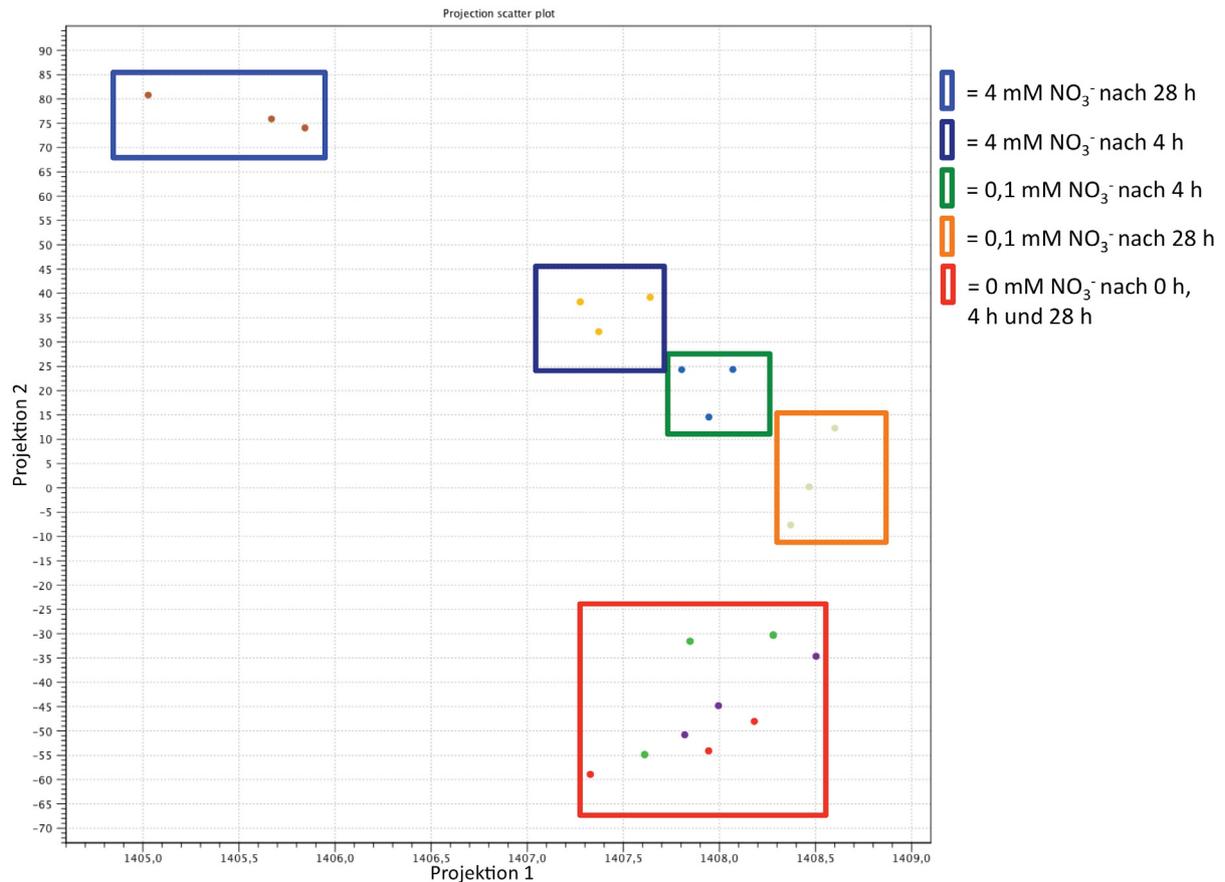


Abbildung 49. PCA der Einzelerperimente der Linie TH.

Die graphische Darstellung der Ergebnisse der PCA für die Einzelerperimente der Linie TH, zeigt eine gute Vergleichbarkeit der Einzelerperimente. Die Proben die 4 h bzw. 28 h Nitratkonzentrationen von 0,1 mM bzw. 4 mM ausgesetzt waren liegen jeweils gruppiert beieinander (blauer, dunkelblauer, grüner und orangener Kasten). Die Proben denen kein Nitrat zugeführt wurde, zeigten unabhängig vom Erntezeitpunkt die wenigstens Unterschiede (roter Kasten).

Die genommen Wurzelgewebeproben der Linie SL zeigten für alle biologisch unabhängigen Wiederholungen bei Stickstoffzufuhr ein ähnliches Bild wie TH (siehe Abbildung 50). Dies gilt eingeschränkt auch für die Proben ohne Nitratzufuhr. Nur eine ein Probe 4 h nach der ersten Entnahme ohne Nitratzufuhr, weichte von allen anderen Proben ohne Zugabe ab. Dies zeigte sich auch in weiteren Analysen des Datensatzes (Daten nicht gezeigt), weshalb diese Probe nicht für die weiteren Analysen herangezogen wurde.

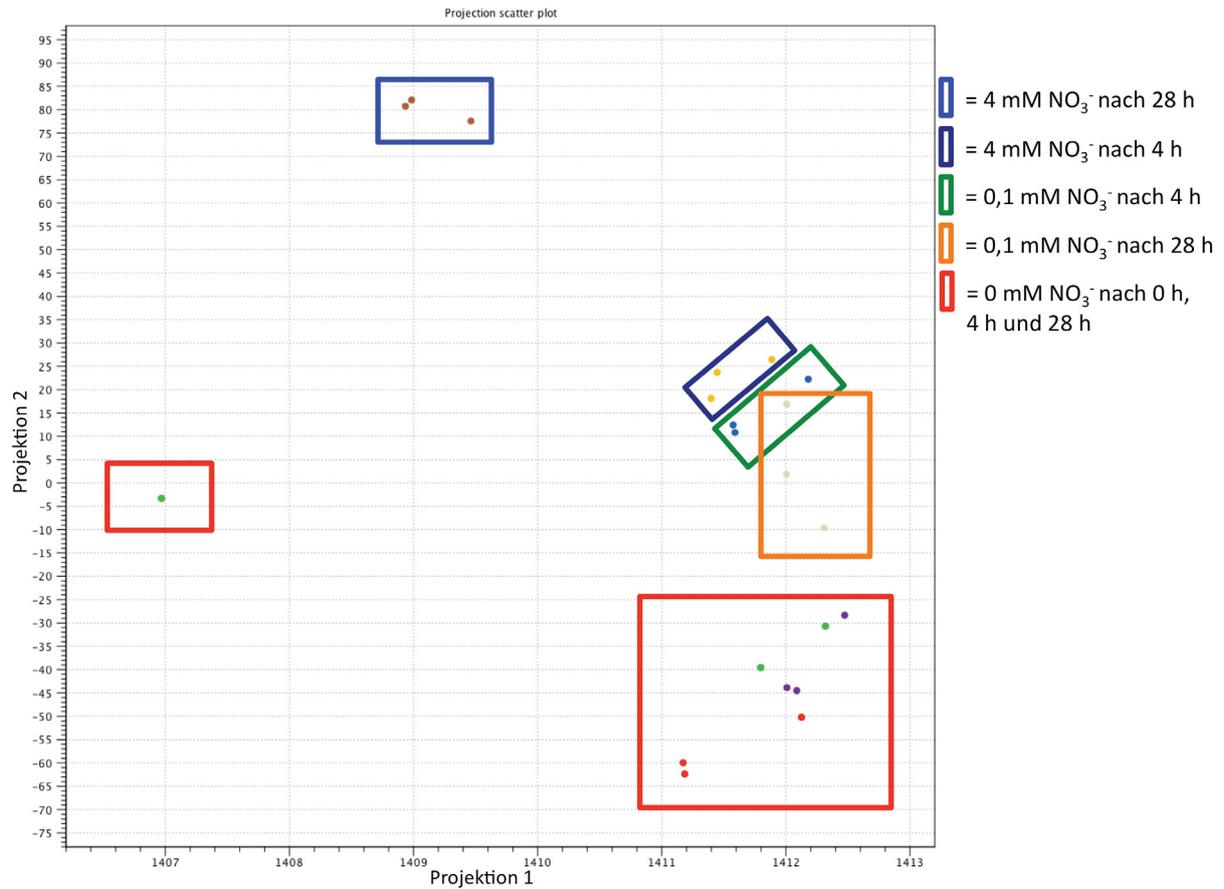


Abbildung 50. PCA der Einzelerperimente der Linie SL.

Die graphische Darstellung der Ergebnisse der PCA für die Einzelerperimente der Linie SL, zeigt eine gute Vergleichbarkeit der Einzelerperimente für fast alle Proben. Die Proben die 4 h bzw. 28 h Nitratkonzentrationen von 0,1 mM bzw. 4 mM ausgesetzt waren liegen jeweils nah gruppiert beieinander (blauer, dunkelblauer, grüner und orangener Kasten). Die Proben denen kein Nitrat zugeführt wurde, zeigten unabhängig vom Erntezeitpunkt die wenigstens Unterschiede (großer roter Kasten). Nur eine Probe von SL welche 4 h nach den ersten Nitratzugaben genommen wurde und selbst zu diesem Zeitpunkt kein Nitrat erhielt, weicht fundamental von den anderen Probe ab.

10 Literaturverzeichnis

- Andorf, C.M., Cannon, E.K., Portwood, J.L., 2nd, Gardiner, J.M., Harper, L.C., Schaeffer, M.L., Braun, B.L., Campbell, D.A., Vinnakota, A.G., Sribalusu, V.V., *et al.* (2016). MaizeGDB update: new tools, data and interface for the maize model organism database. *Nucleic Acids Res* 44, D1195-1201.
- Aslam, M., Travis, R.L., and Huffaker, R.C. (1992). Comparative kinetics and reciprocal inhibition of nitrate and nitrite uptake in roots of uninduced and induced barley (*Hordeum vulgare* L.) seedlings. *Plant Physiol* 99, 1124-1133.
- Bishopp, A., and Lynch, J.P. (2015). The hidden half of crop yields. *Nature Plants* 1.
- Bonser, A.M., Lynch, J., and Snapp, S. (1996). Effect of phosphorus deficiency on growth angle of basal roots in *Phaseolus vulgaris*. *New Phytol* 132, 281-288.
- Brieger, F.G. (1950). The genetic basis of heterosis in maize. *Genetics* 35, 420-445.
- Bruex, A., Kainkaryam, R.M., Wieckowski, Y., Kang, Y.H., Bernhardt, C., Xia, Y., Zheng, X., Wang, J.Y., Lee, M.M., Benfey, P., *et al.* (2012). A gene regulatory network for root epidermis cell differentiation in *Arabidopsis*. *PLoS Genet* 8, e1002446.
- Burton, A.L., Johnson, J., Foerster, J., Hanlon, M.T., Kaeppler, S.M., Lynch, J.P., and Brown, K.M. (2015). QTL mapping and phenotypic variation of root anatomical traits in maize (*Zea mays* L.). *Theor Appl Genet* 128, 93-106.
- Cao, Y., Repo, T., Silvennoinen, R., Lehto, T., and Pelkonen, P. (2010). An appraisal of the electrical resistance method for assessing root surface area. *J Exp Bot* 61, 2491-2497.
- Chardon, F., Noel, V., and Masclaux-Daubresse, C. (2012). Exploring NUE in crops and in *Arabidopsis* ideotypes to improve yield and seed quality. *J Exp Bot* 63, 3401-3412.
- Chloupek, O. (1972). The relationship between electric capacitance and some other parameters of plant roots. *Biologia Plantarum* 14, 227-230.
- Chopin, F., Orsel, M., Dorbe, M.F., Chardon, F., Truong, H.N., Miller, A.J., Krapp, A., and Daniel-Vedele, F. (2007). The *Arabidopsis* ATNRT2.7 nitrate transporter controls nitrate content in seeds. *Plant Cell* 19, 1590-1602.
- Clark, L.J., Price, A.H., Steele, K.A., and Whalley, W.R. (2008). Evidence from near-isogenic lines that root penetration increases with root diameter and bending stiffness in rice. *Functional Plant Biology* 35, 1163-1171.
- Coudert, Y., Le, V.A., Adam, H., Bes, M., Vignols, F., Jouannic, S., Guiderdoni, E., and Gantet, P. (2015). Identification of CROWN ROOTLESS1-regulated genes in rice reveals specific and conserved elements of postembryonic root formation. *New Phytol* 206, 243-254.
- Crawford, N.M. (1995). Nitrate: nutrient and signal for plant growth. *Plant Cell* 7, 859-868.
- Crawford, N.M.a.C., A. D. M. (1998). Molecular and physiological aspects of nitrate uptake in plants. *Trends in Plant Science*, 389-395.
- Curtis, T., and Halford, N.G. (2014). Food security: the challenge of increasing wheat yield and the importance of not compromising food safety. *Ann Appl Biol* 164, 354-372.
- Dalton, F.N. (1995). In-situ root extent measurements by electrical capacitance methods. *Plant and Soil* 173, 157-165.
- Darvasi, A. (1998). Experimental strategies for the genetic dissection of complex traits in animal models. *Nat Genet* 18, 19-24.
- Dietrich, R.C., Bengough A. G., Jones H. G., White P. J. (2013). Can root electrical capacitance be used to predict root mass in soil? *Annals of Botany* 112, 457-464.

Du, Z., Zhou, X., Ling, Y., Zhang, Z., and Su, Z. (2010). agriGO: a GO analysis toolkit for the agricultural community. *Nucleic Acids Res* 38, W64-70.

Earl, C.D., and Ausubel, F.M. (1983). The genetic engineering of nitrogen fixation. *Nutr Rev* 41, 1-6.

Ellis, T., Murray, W. , Kavalieris L. (2013a). Electrical capacitance of bean (*Vicia faba*) root systems was related to tissue density—a test for the Dalton Model. *Plant and Soil* 366, 575-584.

Ellis, T., Murray, W., Keryn, P., Kavalieris, L., Brophy, J., Williams, C., Maass M. (2013b). Electrical capacitance as a rapid and non-invasive indicator of root length. *Tree Physiology* 33, 3-17.

FAO Towards a new Green Revolution. <http://www.fao.org>.

Foley, J.A., Ramankutty, N., Brauman, K.A., Cassidy, E.S., Gerber, J.S., Johnston, M., Mueller, N.D., O'Connell, C., Ray, D.K., West, P.C., *et al.* (2011). Solutions for a cultivated planet. *Nature* 478, 337-342.

Gahoonia, T.S., Nielsen, N.E., and Lyshede, O.B. (1999). Phosphorus (P) acquisition of cereal cultivars in the field at three levels of P fertilization. *Plant and Soil* 211, 269-281.

Galinha, C., Hofhuis, H., Luijten, M., Willemsen, V., Blilou, I., Heidstra, R., and Scheres, B. (2007). PLETHORA proteins as dose-dependent master regulators of Arabidopsis root development. *Nature* 449, 1053-1057.

Gallais, A., and Hirel, B. (2004). An approach to the genetics of nitrogen use efficiency in maize. *J Exp Bot* 55, 295-306.

Gallais A., C.M., Bertin P. (2008). *Maydica* 53, 21-28.

Geldermann, H. (1975). Investigations on inheritance of quantitative characters in animals by gene markers I. Methods. *Theor Appl Genet* 46, 319-330.

Gewin, V. (2010). Food: An underground revolution. *Nature* 466, 552-553.

Giehl, R.F., Gruber, B.D., and von Wiren, N. (2014). It's time to make changes: modulation of root system architecture by nutrient signals. *J Exp Bot* 65, 769-778.

Glass, A.D., Britto, D.T., Kaiser, B.N., Kinghorn, J.R., Kronzucker, H.J., Kumar, A., Okamoto, M., Rawat, S., Siddiqi, M.Y., Unkles, S.E., *et al.* (2002). The regulation of nitrate and ammonium transport systems in plants. *J Exp Bot* 53, 855-864.

Good, A., G., Shrawat, A., K., and Muench, D., G., (2004). Can less yield more? Is reducing nutrient input into the environment compatible with maintaining crop production? *Trends in Plant Science* 9, 597-605.

Goron, T.L., Watts, S., Shearer, C., and Raizada, M.N. (2015). Growth in Turface(R) clay permits root hair phenotyping along the entire crown root in cereal crops and demonstrates that root hair growth can extend well beyond the root hair zone. *BMC Res Notes* 8, 143.

Gorska, A., Zwieniecka, A., Holbrook, N.M., and Zwieniecki, M.A. (2008). Nitrate induction of root hydraulic conductivity in maize is not correlated with aquaporin expression. *Planta* 228, 989-998.

Guo-dong, L.D., J., and Phung, T. (2006). Induction of Root Hair Growth in a Phosphorus-Buffered Culture Solution. *Agricultural Sciences in China* 5, 370-376.

Hamada, H., Petrino, M.G., and Kakunaga, T. (1982). A novel repeated element with Z-DNA-forming potential is widely found in evolutionarily diverse eukaryotic genomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79, 6465-6469.

Hetz, W., Hochholdinger, F., Schwall, M., Feix, G. (1996). Isolation and characterisation of *rctc* a mutant deficient in the formation of nodal roots. *The Plant Journal* 10, 845-857.

Hirel, B., Bertin, P., Quillere, I., Bourdoncle, W., Attagnant, C., Dellay, C., Gouy, A., Cadiou, S., Retailliau, C., Falque, M., *et al.* (2001). Towards a better understanding of the genetic

and physiological basis for nitrogen use efficiency in maize. *Plant Physiol* *125*, 1258-1270.

Hirsch, P.R., and Mauchline, T.H. (2015). The Importance of the Microbial N Cycle in Soil for Crop Plant Nutrition. *Adv Appl Microbiol* *93*, 45-71.

Hochholdinger, F. (2009). The Maize Root System: Morphology, Anatomy and Genetics. *The Handbook of Maize*, 145-160.

Hochholdinger, F., and Feix, G. (1998). Early post-embryonic root formation is specifically affected in the maize mutant *lrt1*. *Plant J* *16*, 247-255.

Hochholdinger, F., Park, W.J., and Feix, G.H. (2001). Cooperative action of *SLR1* and *SLR2* is required for lateral root-specific cell elongation in maize. *Plant Physiol* *125*, 1529-1539.

Hochholdinger, F., and Tuberosa, R. (2009). Genetic and genomic dissection of maize root development and architecture. *Curr Opin Plant Biol* *12*, 172-177.

Hochholdinger, F., Wen, T.J., Zimmermann, R., Chimot-Marolle, P., da Costa e Silva, O., Bruce, W., Lamkey, K.R., Wienand, U., and Schnable, P.S. (2008). The maize (*Zea mays* L.) rootless 3 gene encodes a putative GPI-anchored, monocot-specific, COBRA-like protein that significantly affects grain yield. *Plant J* *54*, 888-898.

Hochholdinger, F., Woll, K., Sauer, M., and Dembinsky, D. (2004). Genetic dissection of root formation in maize (*Zea mays*) reveals root-type specific developmental programmes. *Ann Bot* *93*, 359-368.

Hund, A., Reimer, R., and R., M. (2011). A consensus map of QTLs controlling the root length of maize. *Plant and Soil* *344*, 143-158.

Husakova, E., Hochholdinger, F., and Soukup, A. (2013). Lateral root development in the maize (*Zea mays*) lateral rootless1 mutant. *Ann Bot* *112*, 417-428.

Ikinci, A. (2014). Influence of pre- and postharvest summer pruning on the growth, yield, fruit quality, and carbohydrate content of early season peach cultivars. *ScientificWorldJournal* *2014*, 104865.

Inukai, Y., Sakamoto, T., Ueguchi-Tanaka, M., Shibata, Y., Gomi, K., Umemura, I., Hasegawa, Y., Ashikari, M., Kitano, H., and Matsuoka, M. (2005). Crown rootless1, which is essential for crown root formation in rice, is a target of an AUXIN RESPONSE FACTOR in auxin signaling. *Plant Cell* *17*, 1387-1396.

Iwakawa, H., Ueno, Y., Semiarti, E., Onouchi, H., Kojima, S., Tsukaya, H., Hasebe, M., Soma, T., Ikezaki, M., Machida, C., *et al.* (2002). The *ASYMMETRIC LEAVES2* gene of *Arabidopsis thaliana*, required for formation of a symmetric flat leaf lamina, encodes a member of a novel family of proteins characterized by cysteine repeats and a leucine zipper. *Plant Cell Physiol* *43*, 467-478.

Jenkins, M.T. (1930). Heritable characters of maize XXXIV-rootless. *J Hered*, 79-80.

Jensen, P.J., Rytter, J., Detwiler, E.A., Travis, J.W., and McNellis, T.W. (2003). Rootstock effects on gene expression patterns in apple tree scions. *Plant Mol Biol* *53*, 493-511.

Kronzucker, H.J., Glass, A.D., and Yaeesh Siddiqi, M. (1999a). Inhibition of nitrate uptake by ammonium in barley. Analysis Of component fluxes. *Plant Physiol* *120*, 283-292.

Kronzucker, H.J., Siddiqi, M.Y., and Glass, A. (1995). Analysis of $^{13}\text{NH}_4^+$ Efflux in Spruce Roots (A Test Case for Phase Identification in Compartmental Analysis). *Plant Physiol* *109*, 481-490.

Kronzucker, H.J., Siddiqi, M.Y., Glass, A.D., and Kirk, G.J. (1999b). Nitrate-ammonium synergism in rice. A subcellular flux analysis. *Plant Physiol* *119*, 1041-1046.

Lid, S.E., Al, R.H., Krekling, T., Meeley, R.B., Ranch, J., Opsahl-Ferstad, H.G., and Olsen, O.A. (2004). The maize disorganized aleurone layer 1 and 2 (*dil1*, *dil2*) mutants lack control of the mitotic division plane in the aleurone layer of developing endosperm. *Planta* *218*, 370-378.

Lima, J.E., Kojima, S., Takahashi, H., and von Wieren, N. (2010). Ammonium triggers lateral root branching in Arabidopsis in an AMMONIUM TRANSPORTER1;3-dependent manner. *Plant Cell* 22, 3621-3633.

Liu, H., Wang, S., Yu, X., Yu, J., He, X., Zhang, S., Shou, H., and Wu, P. (2005). ARL1, a LOB-domain protein required for adventitious root formation in rice. *Plant J* 43, 47-56.

Liu, W.Y., Chang, Y.M., Chen, S.C., Lu, C.H., Wu, Y.H., Lu, M.Y., Chen, D.R., Shih, A.C., Sheue, C.R., Huang, H.C., *et al.* (2013). Anatomical and transcriptional dynamics of maize embryonic leaves during seed germination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 3979-3984.

Liu, Y.F., Qi, H.Y., Bai, C.M., Qi, M.F., Xu, C.Q., Hao, J.H., Li, Y., and Li, T.L. (2011). Grafting helps improve photosynthesis and carbohydrate metabolism in leaves of muskmelon. *Int J Biol Sci* 7, 1161-1170.

Lopez-Bucio, J., Cruz-Ramirez, A., and Herrera-Estrella, L. (2003). The role of nutrient availability in regulating root architecture. *Curr Opin Plant Biol* 6, 280-287.

Lynch, J.P. (2007). Roots of the Second Green Revolution. *Australian Journal of Botany* 55, 493-512

Lynch, J.P. (2011). Root phenes for enhanced soil exploration and phosphorus acquisition: tools for future crops. *Plant Physiol* 156, 1041-1049.

Lynch, J.P. (2013). Steep, cheap and deep: an ideotype to optimize water and N acquisition by maize root systems. *Ann Bot* 112, 347-357.

Lynch, J.P., and Brown, K.M. (2012). New roots for agriculture: exploiting the root phenome. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 367, 1598-1604.

Mackay, T.F. (2001). Quantitative trait loci in Drosophila. *Nat Rev Genet* 2, 11-20.

Majer, C., Xu, C., Berendzen, K.W., and Hochholdinger, F. (2012). Molecular interactions of ROOTLESS CONCERNING CROWN AND SEMINAL ROOTS, a LOB domain protein regulating shoot-borne root initiation in maize (*Zea mays* L.). *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 367, 1542-1551.

Mallmann, J., Heckmann, D., Brautigam, A., Lercher, M.J., Weber, A.P., Westhoff, P., and Gowik, U. (2014). The role of photorespiration during the evolution of C4 photosynthesis in the genus Flaveria. *Elife* 3, e02478.

Meharg, A.A., and Blatt, M.R. (1995). NO₃- transport across the plasma membrane of Arabidopsis thaliana root hairs: kinetic control by pH and membrane voltage. *J Membr Biol* 145, 49-66.

Meksem, K., Shultz, J., Tebbji, F., Jamai, A., Henrich, J., Kranz, H., Arenz, M., Schlueter, T., Ishihara, H., Jyothi, L.N., *et al.* (2005). A bacterial artificial chromosome based physical map of the Ustilago maydis genome. *Genome* 48, 207-216.

Miguel, M.A., Postma, J.A., and Lynch, J.P. (2015). Phene synergism between root hair length and basal root growth angle for phosphorus acquisition. *Plant Physiol* 167, 1430-1439.

Moll, R., H., Kamprath, E., J., and Jackson, W., A. (1987). Development of nitrogen efficient prolific hybrids of maize. *Crop Science* 27, 181-186.

Nasholm, T., Ekblad, A., Nordin, A., Giesler, R., Hogberg, M., and Hogberg, P. (1998). Boreal forest plants take up organic nitrogen. *Nature* 392, 914-916.

Nazariuk, V.M., Sidorova, K.K., Shumny, V.K., Kallimullina, F.R., and Klenova, M.I. (2006). [Physiological and agrochemical properties of different symbiotic genotypes of pea (*Pisum sativum* L.)]. *Izv Akad Nauk Ser Biol*, 688-697.

Nestler, J., Liu, S., Wen, T.J., Paschold, A., Marcon, C., Tang, H.M., Li, D., Li, L., Meeley, R.B., Sakai, H., *et al.* (2014). Roothairless5, which functions in maize (*Zea mays* L.) root hair initiation and elongation encodes a monocot-specific NADPH oxidase. *Plant J* 79, 729-740.

Nilsen, E.T., Freeman, J., Grene, R., and Tokuhisa, J. (2014). A rootstock provides water conservation for a grafted commercial tomato (*Solanum lycopersicum* L.) line in response to mild-drought conditions: a focus on vegetative growth and photosynthetic parameters. *PLoS One* 9, e115380.

Nybom, H., Weising, K., and Rotter, B. (2014). DNA fingerprinting in botany: past, present, future. *Investig Genet* 5, 1.

O'Brien, J.A., Vega, A., Bouguyon, E., Krouk, G., Gojon, A., Coruzzi, G., and Gutierrez, R.A. (2016). Nitrate Transport, Sensing, and Responses in Plants. *Mol Plant* 9, 837-856.

Okamoto, M., Kumar, A., Li, W., Wang, Y., Siddiqi, M.Y., Crawford, N.M., and Glass, A.D. (2006). High-affinity nitrate transport in roots of *Arabidopsis* depends on expression of the NAR2-like gene *AtNRT3.1*. *Plant Physiol* 140, 1036-1046.

Omori F., M.Y. (2007). QTL mapping of root angle in F2 populations from maize 'B73' x teosinte 'Zea luxurians'. *Plant Root*, 57-65.

Orsel, M., Krapp, A., and Daniel-Vedele, F. (2002). Analysis of the NRT2 nitrate transporter family in *Arabidopsis*. Structure and gene expression. *Plant Physiol* 129, 886-896.

Osuna, D., Prieto, P., and Aguilar, M. (2015). Control of Seed Germination and Plant Development by Carbon and Nitrogen Availability. *Front Plant Sci* 6, 1023.

Pages, L., and Picon-Cochard, C. (2014). Modelling the root system architecture of Poaceae. Can we simulate integrated traits from morphological parameters of growth and branching? *New Phytol* 204, 149-158.

Papst, C., Bohn, M., Utz, H.F., Melchinger, A.E., Klein, D., and Eder, J. (2004). QTL mapping for European corn borer resistance (*Ostrinia nubilalis* Hb.), agronomic and forage quality traits of testcross progenies in early-maturing European maize (*Zea mays* L.) germplasm. *Theor Appl Genet* 108, 1545-1554.

Parker, J.S., Cavell, A.C., Dolan, L., Roberts, K., and Grierson, C.S. (2000). Genetic interactions during root hair morphogenesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 12, 1961-1974.

Paszkowski, U., and Boller, T. (2002). The growth defect of *lrt1*, a maize mutant lacking lateral roots, can be complemented by symbiotic fungi or high phosphate nutrition. *Planta* 214, 584-590.

Paterson, A.H. (1995). Molecular dissection of quantitative traits: progress and prospects. *Genome Res* 5, 321-333.

Patterson, K., Walters, L.A., Cooper, A.M., Olvera, J.G., Rosas, M.A., Rasmusson, A.G., and Escobar, M.A. (2016). Nitrate-Regulated Glutaredoxins Control *Arabidopsis* Primary Root Growth. *Plant Physiol* 170, 989-999.

Peret, B., De Rybel, B., Casimiro, I., Benkova, E., Swarup, R., Laplace, L., Beeckman, T., and Bennett, M.J. (2009). *Arabidopsis* lateral root development: an emerging story. *Trends Plant Sci* 14, 399-408.

Pestsova, E., Lichtblau, D., Wever, C., Presterl, T., Bolduan, T., Ouzunova, M., and Westhoff, P. (2016). QTL mapping of seedling root traits associated with nitrogen and water use efficiency in maize. *Euphytica* 207.

Petricka, J.J., Winter, C.M., and Benfey, P.N. (2012). Control of *Arabidopsis* root development. *Annu Rev Plant Biol* 63, 563-590.

Plett, D., Toubia, J., Garnett, T., Tester, M., Kaiser, B.N., and Baumann, U. (2010). Dichotomy in the NRT gene families of dicots and grass species. *PLoS One* 5, e15289.

Postma, J.A., Dathe, A., and Lynch, J.P. (2014). The optimal lateral root branching density for maize depends on nitrogen and phosphorus availability. *Plant Physiol* 166, 590-602.

Postma, J.A., and Lynch, J.P. (2011). Root cortical aerenchyma enhances the growth of maize on soils with suboptimal availability of nitrogen, phosphorus, and potassium. *Plant Physiol* 156, 1190-1201.

Poudel, D.D., Horwath, W.R., Mitchell, J.P., and Temple, S.R. (2001). Impacts of cropping systems on soil nitrogen storage and loss. *Agricultural Systems* 68, 253-268.

Presterl, T., Seitz, G.L., M., and Thiemt, E.M.S., W. Geiger, H. H. (2003). Improving Nitrogen-Use Efficiency in European Maize: Estimation of Quantitative Genetic Parameters. *Crop Science* 43, 1259-1265.

Prigge, V., and Melchinger, A.E. (2012). Production of haploids and doubled haploids in maize. *Methods Mol Biol* 877, 161-172.

Quan, Z., Huang, B., Lu, C., Shi, Y., Chen, X., Zhang, H., and Fang, Y. (2016). The fate of fertilizer nitrogen in a high nitrate accumulated agricultural soil. *Sci Rep* 5, 21539.

Rasmusson, D.C., and Phillips, R.L. (1997). Plant breeding progress and genetic diversity from de novo variation and elevated epistasis. *Crop Science* 37, 303-310.

Raun, W.R., and Johnson, G.V. (1999). Improving Nitrogen Use Efficiency for Cereal Production. *Agronomy Journal* 91, 357-363.

Sabelli, P.A., and Larkins, B.A. (2009). The development of endosperm in grasses. *Plant Physiol* 149, 14-26.

Saengwilai, P., Nord, E.A., Chimungu, J.G., Brown, K.M., and Lynch, J.P. (2014). Root cortical aerenchyma enhances nitrogen acquisition from low-nitrogen soils in maize. *Plant Physiol* 166, 726-735.

Samayoa, L.F., Malvar, R.A., McMullen, M.D., and Butron, A. (2015). Identification of QTL for resistance to Mediterranean corn borer in a maize tropical line to improve temperate germplasm. *BMC Plant Biol* 15, 265.

Sax, K. (1923). The Association of Size Differences with Seed-Coat Pattern and Pigmentation in PHASEOLUS VULGARIS. *Genetics* 8, 552-560.

Schlesinger, W.H. (2009). On the fate of anthropogenic nitrogen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 203-208.

Schroeder, A., Mueller, O., Stocker, S., Salowsky, R., Leiber, M., Gassmann, M., Lightfoot, S., Menzel, W., Granzow, M., and Ragg, T. (2006). The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Mol Biol* 7, 3.

Shuai, B., Reynaga-Pena, C.G., and Springer, P.S. (2002). The lateral organ boundaries gene defines a novel, plant-specific gene family. *Plant Physiol* 129, 747-761.

Siddiqi, M.Y., Glass, A.D., Ruth, T.J., and Rufty, T.W. (1990). Studies of the Uptake of Nitrate in Barley: I. Kinetics of NO₃ Influx. *Plant Physiol* 93, 1426-1432.

Sprague, G.F. (1946). The experimental basis for hybrid maize. *Biol Rev Camb Philos Soc* 21, 101-120.

Tanksley, S.D., and Nelson, J.C. (1996). Advanced backcross QTL analysis: a method for the simultaneous discovery and transfer of valuable QTLs from unadapted germplasm into elite breeding lines. *Theor Appl Genet* 92, 191-203.

Taramino, G., Sauer, M., Stauffer, J.L., Jr., Multani, D., Niu, X., Sakai, H., and Hochholdinger, F. (2007). The maize (*Zea mays* L.) RTCS gene encodes a LOB domain protein that is a key regulator of embryonic seminal and post-embryonic shoot-borne root initiation. *Plant J* 50, 649-659.

Trachsel, S., Kaeppler, S.M., Brown, K.M., and Lynch, J.P. (2013). Maize root growth angles become steeper under low N conditions. *Field Crops Research* 140, 18-31.

Trachsel, S., Kaeppler, S. M., Brown, K. M., Lynch, J.P. (2011). Shovelomics: high throughput phenotyping of maize (*Zea mays* L.) root architecture in the field. *Plant and Soil* 341, 75-87.

Trevisan, S., Manoli, A., Begheldo, M., Nonis, A., Enna, M., Vaccaro, S., Caporale, G., Ruperti, B., and Quaggiotti, S. (2011). Transcriptome analysis reveals coordinated spatiotemporal regulation of hemoglobin and nitrate reductase in response to nitrate in maize roots. *New Phytol* 192, 338-352.

Tsay, Y.F., Chiu, C.C., Tsai, C.B., Ho, C.H., and Hsu, P.K. (2007). Nitrate transporters and peptide transporters. *FEBS Lett* 581, 2290-2300.

Tuberosa, R., Sanguineti, M.C., Landi, P., Giuliani, M.M., Salvi, S., and Conti, S. (2002). Identification of QTLs for root characteristics in maize grown in hydroponics and analysis of their overlap with QTLs for grain yield in the field at two water regimes. *Plant Mol Biol* 48, 697-712.

Uga, Y., Okuno, K., and Yano, M. (2011). *Dro1*, a major QTL involved in deep rooting of rice under upland field conditions. *J Exp Bot* 62, 2485-2494.

Uga, Y., Sugimoto, K., Ogawa, S., Rane, J., Ishitani, M., Hara, N., Kitomi, Y., Inukai, Y., Ono, K., Kanno, N., *et al.* (2013). Control of root system architecture by DEEPER ROOTING 1 increases rice yield under drought conditions. *Nat Genet* 45, 1097-1102.

van Beem, J., Smith, M. E. , Zobel, R. W. (1998). Estimating Root Mass in Maize Using a Portable Capacitance Meter. *Agronomy Journal* 90, 566-570.

von Behrens I., K.M., Zhang Y., Berendzen K.W., Niu X., Sakai H., Taramino G., Hochholdinger F. (2011). Rootless with undetectable meristem 1 encodes a monocot-specific AUX/IAA protein that controls embryonic seminal and post-embryonic lateral root initiation in maize. *The Plant Journal* 66, 341-353.

Wang, R., and Crawford, N.M. (1996). Genetic identification of a gene involved in constitutive, high-affinity nitrate transport in higher plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 9297-9301.

Wang, R., Guegler, K., LaBrie, S.T., and Crawford, N.M. (2000). Genomic analysis of a nutrient response in *Arabidopsis* reveals diverse expression patterns and novel metabolic and potential regulatory genes induced by nitrate. *Plant Cell* 12, 1491-1509.

Wang, R., Liu, D., and Crawford, N.M. (1998). The *Arabidopsis* CHL1 protein plays a major role in high-affinity nitrate uptake. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 15134-15139.

Wen, T.J., Hochholdinger, F., Sauer, M., Bruce, W., and Schnable, P.S. (2005). The *roothairless1* gene of maize encodes a homolog of *sec3*, which is involved in polar exocytosis. *Plant Physiol* 138, 1637-1643.

Wen, T.J., and Schnable, P.S. (1994). Analyses of Mutants of Three Genes that Influence Root Hair Development in *Zea mays* (Gramineae) Suggest that Root Hairs are Dispensable. *American Journal of Botany* 81, 833-842.

Westhoff, P., Offermann-Steinhard, K., Hofer, M., Eskins, K., Oswald, A., and Streubel, M. (1991). Differential accumulation of plastid transcripts encoding photosystem II components in the mesophyll and bundle-sheath cells of monocotyledonous NADP-malic enzyme-type C4 plants. *Planta* 184, 377-388.

Wever, C. (2010). Untersuchung des Wurzelwachstums züchterisch genutzter Maislinien bei verschiedener N-Zufuhr.

Weyer, P.J., Cerhan, J.R., Kross, B.C., Hallberg, G.R., Kantamneni, J., Breuer, G., Jones, M.P., Zheng, W., and Lynch, C.F. (2001). Municipal drinking water nitrate level and cancer risk in older women: the Iowa Women's Health Study. *Epidemiology* 12, 327-338.

Xiao, Y., Thatcher, S., Wang, M., Wang, T., Beatty, M., Zastrow-Hayes, G., Li, L., Li, J., Li, B., and Yang, X. (2015). Transcriptome analysis of near-isogenic lines provides molecular insights into starch biosynthesis in maize kernel. *J Integr Plant Biol*.

York, L.M., Galindo-Castaneda, T., Schussler, J.R., and Lynch, J.P. (2015). Evolution of US maize (*Zea mays* L.) root architectural and anatomical phenes over the past 100 years corresponds to increased tolerance of nitrogen stress. *J Exp Bot* 66, 2347-2358.

York, L.M., Silberbush, M., and Lynch, J.P. (2016). Spatiotemporal variation of nitrate uptake kinetics within the maize (*Zea mays* L.) root system is associated with greater nitrate uptake and interactions with architectural phenes. *J Exp Bot*.

- Yu, P., Hochholdinger, F., and Li, C. (2015). Root-type-specific plasticity in response to localized high nitrate supply in maize (*Zea mays*). *Ann Bot* 116, 751-762.
- Yu, P., Li, X., Yuan, L., and Li, C. (2014). A novel morphological response of maize (*Zea mays*) adult roots to heterogeneous nitrate supply revealed by a split-root experiment. *Physiol Plant* 150, 133-144.
- Zhang, H., Jennings, A., Barlow, P.W., and Forde, B.G. (1999). Dual pathways for regulation of root branching by nitrate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 6529-6534.
- Zhu, J., Brown, K.M., and Lynch, J.P. (2010). Root cortical aerenchyma improves the drought tolerance of maize (*Zea mays* L.). *Plant Cell Environ* 33, 740-749.
- Zhu, J., and Lynch, J.P. (2004). The contribution of lateral rooting to phosphorus acquisition efficiency in maize (*Zea mays* L.) seedlings. *Functional Plant Biology* 31, 949-958.
- Zhuo, D., Okamoto, M., Vidmar, J.J., and Glass, A.D. (1999). Regulation of a putative high-affinity nitrate transporter (*Nrt2;1At*) in roots of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 17, 563-568.

11 Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides Statt, dass die Dissertation von mir selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist.