

Abschlussbericht Teilprojekt 9

Verbesserte Stressresistenz und Phosphataufnahme durch Symbiose

Projektverbund BayKlimaFit

Strategien zur Anpassung von Kulturpflanzen an den
Klimawandel

Finanziert durch

Bayerisches Staatsministerium für
Umwelt und Verbraucherschutz
Rosenkavalierplatz 2
81925 München

Projektnehmer

Technische Universität München
Wissenschaftszentrum Weihenstephan

Caroline Gutjahr, Prof. Dr.
(Emmy Noether Gruppenleiterin)
Emil Ramann Straße 4
D-85354 Freising
Tel.: 089-8161 71 2680 / Fax: 089-8161 71 4500
E-Mail: caroline.gutjahr@tum.de

Web: www.genetik.wzw.tum.de und www.bayklimafit.de

Berichtszeitraum:

1. Februar 2016 bis 31. Januar 2019
(Vom 01.02.2016 – 31.03.2018 wurde das Projekt an der
Ludwig-Maximilian-Universität München durchgeführt.)

1 Inhaltsverzeichnis

2	Kurzzusammenfassung.....	3
3	Einführung.....	4
4	Zielstellung.....	5
4.1	Phänotypisierung AM vermittelter Stresstoleranz.....	5
4.2	Automatisierte Phänotypisierung.....	6
5	Ergebnisse und Diskussion.....	7
5.1	Phänotypisierung AM vermittelter Stresstoleranz.....	7
5.1.1	Durchgeführte Versuche und Arbeiten.....	7
5.1.2	Ergebnisse.....	9
5.1.3	Diskussion.....	12
5.2	Automatisierte Phänotypisierung.....	14
5.2.1	Durchgeführte Versuche und Arbeiten.....	14
5.2.2	Ergebnisse.....	15
5.2.3	Diskussion.....	16
6	Stellungnahme zum Projekterfolg.....	18
6.1	Phänotypisierung AM vermittelter Stresstoleranz.....	18
6.2	Automatisierte Phänotypisierung.....	18
7	Nutzen der Projektergebnisse.....	20
8	Die Projektergebnisse im Bezug zum Klimawandel.....	21
9	Veröffentlichungen im Rahmen des Projekts.....	23
10	Vernetzung zu weiteren Verbundpartnern und anderen Partnern.....	25
11	Zusammenfassung.....	26
12	Ausblick.....	28
13	Literaturverzeichnis.....	29
14	Abkürzungsverzeichnis.....	30
15	Anhang.....	31

2 Kurzzusammenfassung

Das optimale Zusammenspiel von Maispflanzen mit Arbuskulären Mycorrhiza (AM) Pilzen hat das Potential, sowohl die Resistenz von Kulturpflanzen gegen ungünstige Klimabedingungen zu erhöhen, als auch die Einsparung von Kunstdünger in der Landwirtschaft bei gleichbleibenden Erträgen zu ermöglichen. Hierzu sollte in diesem Projekt die Reaktion Europäischer Mais-Linien auf AM-Symbionten im Hinblick auf Wachstumsverbesserungen und gesteigerte Trockenstressresistenz charakterisiert werden.

Dazu wurde in den Jahren 2016 und 2017 in jeweils zwei Feldversuchen, sowohl unter praxisüblichen, offen beregneten Feldbedingungen als auch unter Trockenstress, ein diverses Set von europäischen Mais-Linien mit und ohne zusätzliche Mykorrhiza-Behandlung auf verschiedene Leistungsparameter untersucht. In den Jahren 2017 und 2018 wurde jeweils zusätzlich ein Feldversuch in einem Feld mit niedrigem pflanzenverfügbaren Phosphorgehalt (P) im Boden durchgeführt.

Um die Wachstumssteigerung durch AM Symbiose unbeeinflusst von freien AM-Spezies und Wetterschwankungen testen zu können, wurden im dritten Versuchsjahr die Mais-Genotypen in einer automatisierten Gewächshausanlage unter semi-kontrollierten Bedingungen auf Ihre AM-Antwort getestet.

Im Ergebnis zeigten sich in den Feldversuchen sowohl individuelle Unterschiede zwischen den verschiedenen Maislinien in der Antwort auf Trockenstress und niedrig-P Bedingungen *per se*, als auch in ihrer Antwort auf die AM-Behandlung unter diesen Stressbedingungen.

Im Gewächshausversuch wurde das enorme Potential der Wachstumssteigerung durch AM-Symbiose besonders deutlich. Hier war für alle getesteten Genotypen eine deutliche Biomassezunahme zu verzeichnen. Außerdem wurden klare Unterschiede in der AM-Antwort zwischen den Linien nachgewiesen.

Insgesamt zeigte sich für die einzelnen Mais-Linien sowohl eine Umwelt-abhängige als auch eine Umwelt-unabhängige Fähigkeit, auf die AM Symbiose mit Produktivitätssteigerungen zu reagieren.

Diese Ergebnisse gilt es in der Zukunft in weiteren Versuchen zu präzisieren und die zugrundeliegenden Mechanismen und genetischen Variationen im Detail zu untersuchen. Zusammenfassend wurde das Ziel einer ersten Charakterisierung der AM-Antwort für eine Auswahl europäischer Maislinien im Feld erreicht. Es wurden einige Linien identifiziert, welche insbesondere unter Trockenstress und unter niedriger Phosphat-Verfügbarkeit eine positive Leistungsantwort auf AM zeigen.

3 Einführung

Arbuskuläre Mykorrhiza (AM) stellt eine wichtige evolutionäre Anpassung von Pflanzen an Bedingungen niedriger Nährstoffverfügbarkeit im Boden dar [1]. AM Pilze bilden ein stark verzweigtes Hyphennetzwerk im Boden aus, über welches sie besonders effizient Mineralnährstoffe (insbesondere Phosphat) aus dem Boden aufnehmen und nachweislich die Ernährung und Produktivität von Pflanzen bei geringer Phosphatverfügbarkeit verbessern können [2]. Des Weiteren erhöht AM die Resistenz von Pflanzen gegen abiotischen und biotischen Stress wie zum Beispiel Trockenheit, Bodenversalzung und Krankheitserreger [3] bis [7]. In Bezug auf Trockenstress-Resistenz wurde z. B. gezeigt, dass mykorrhizierte Pflanzen unter Trockenstress mehr Biomasse produzieren können [8] sowie eine erhöhte stomatare Leitfähigkeit und einen erhöhten apoplastischen Wasserfluss in der Wurzel aufweisen [9]. AM birgt daher ein großes Potential, einerseits für die Anwendung in nachhaltiger Landwirtschaft mit reduziertem Kunstdünger- und Pestizideintrag [10], und andererseits zur Pufferung ungünstiger Wetterereignisse wie z. B. lange Trockenperioden, welche aufgrund des Klimawandels zunehmend zu verzeichnen sind. Durch Züchtung von AM-optimierten Kulturpflanzensorten könnte der landwirtschaftliche Nutzen durch AM erhöht werden [11]. Aus Gewächshaus-basierten Untersuchungen verschiedener Sorten von Mais geht hervor, dass AM unterschiedliche Wachstumsantworten von verschiedenen Sorten innerhalb derselben Art hervorruft [12]. Diese „individuelle“ Wachstumssteigerung durch AM wird im Folgenden als AM Responsivität bezeichnet. Sie weist darauf hin, dass es innerhalb einer Art noch unbekannte genetische Variationen gibt, welche die AM-Responsivität bestimmen und züchterisch genutzt werden können.

Neue Forschungsergebnisse betonen zusätzlich die Bedeutung der optimalen Zusammensetzung der Gemeinschaft der AM-Pilze für die Nährstoff-Aufnahme und die Wachstumssteigerung einer Wirtspflanzensorte [13][14]. Man nimmt an, dass hier genetische Kompatibilitäten zwischen Pflanze- und Pilzgenotypen eine Rolle spielen [15].

4 Zielstellung

In diesem Projekt sollte die genetische Variation in der pflanzlichen Antwort auf AM in Wachstum und Entwicklung, in der Phosphataufnahme und Trockenstressresistenz in Mais unter verschiedenen Testbedingungen untersucht werden, um zur Lösung der Frage beizutragen, wie die genetische Variabilität von Kulturpflanzen genutzt werden kann, um durch AM Symbiose Stressresistenz gegen Klimawandel bedingte Wetterereignisse und einen produktiveren Anbau mit verringerten Einträgen zu erzielen (Abb.1).

Hierzu sollte in diesem Projekt eine diverse Sammlung genetisch gut charakterisierter europäischer Maissorten („EU NAM“ Population) [16] durch Kombination klassischer Feldversuche mit modernen Methoden der quantitativen Genetik untersucht werden um a) optimal AM-responsive Mais Sorten zu finden, b) im nächsten Schritt agronomische Eigenschaften und genetische Faktoren zu identifizieren, welche die AM-vermittelte Widerstandskraft von Mais in Bezug auf Phosphathunger und Trockenstress bestimmen und c) die Grundlage für die Entschlüsselung molekularer Mechanismen der AM Responsivität zu schaffen.

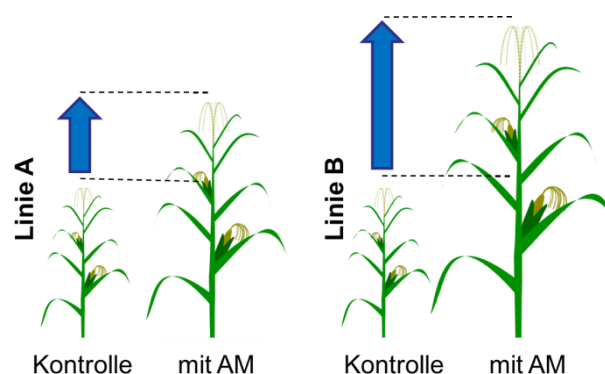


Abb. 1: Unterschiedliche AM-Responsivität (↑) zweier Mais-Linien in Bezug auf die Pflanzen-Wachstumssteigerung

Im Berichtszeitraum vorgesehen war hier vor allem eine erste Charakterisierung der möglichen Variation in europäischen Mais-Genotypen im Hinblick auf eine positive Reaktion auf Mykorrhiza-Symbiose unter verschiedenen Umweltbedingungen im Feld und im Gewächshaus. Für eine bessere Phänotypisierung in verschiedenen Umwelten wurde zusätzlich ein drittes Feld mit niedriger Phosphat-Verfügbarkeit in die Versuche hinzugenommen, und der Gewächshausversuch im dritten Projektjahr durchgeführt.

4.1 Phänotypisierung AM vermittelter Stresstoleranz

Arbeitspaket 1:

Um optimal AM-responsive Mais Genotypen zu ermitteln und die genetische Architektur der Mykorrhiza-vermittelten Trockenstress-Resistenz und der funktionellen Kompatibilität zu erforschen, sollte während der Sommerhalbjahre zunächst die AM-Responsivität der El-

ternlinien der EU NAM Population im Feld und im kleineren Maßstab im Rollhaus (Trockenstress-Induktion), erweitert um einen Versuch unter niedrig-P Bedingungen, phänotypisiert werden. Die Teilziele waren hierbei folgende:

- Untersuchung der geno- und phänotypischen Variation in europäischen Mais-Linien bezüglich AM-vermittelter Wachstumssteigerung und Phosphataufnahme
- Identifizierung optimal AM-responsiver Linien unter Feldbedingungen
- Untersuchung von möglicher AM-vermittelter Stressresistenz, gemessen an Ertrag und möglicher ^{13}C Isotopendiskriminierung [17], unter Trockenstress und niedrig-P Bedingungen

4.2 Automatisierte Phänotypisierung

Arbeitspaket 2:

Um umfangreiche Kartierungs-Populationen auf eine Wachstumssteigerung durch AM phänotypisieren zu können, ist ein präzises, möglichst einfaches Experimentalsystem nötig, denn unter Feldbedingungen wird die Antwort auf inokulierte Mykorrhizapilze durch die natürliche autochthone AM-Pilz Population im Boden zum Teil maskiert und fällt daher geringer aus, als im Vergleich von besiedelten Pflanzen mit nicht besiedelten Kontrollpflanzen. Für die zuverlässige genetische Kartierung ist aber eine deutliche Wachstumsantwort nötig. Um diese zu ermöglichen, wurde in den ersten zwei Projektjahren ein einfaches, präzises und effektives Testsystem zur Quantifizierung der AM-Antwort in Form eines Gefäßversuchs im Gewächshaus entwickelt.

Im dritten Projektjahr wurde dann die Wachstumsantwort auf AM der Dent-Elternlinien der EU-NAM Population in einem automatisierten LemnaTec Gewächshaussystem getestet und gleichzeitig das LemnaTec System auf seine Eignung für diesen Versuchsansatz evaluiert. Ziel war die Untersuchung der AM-vermittelten Wachstumssteigerung in Abwesenheit maskierender, natürlich im Boden vorkommender AM Pilz Spezies. Die Teilziele waren hierbei folgende:

- Evaluation eines weitgehend automatischen, effektiven Testsystems zur Quantifizierung der AM-Antwort in umfangreichen Mais Populationen
- Untersuchung der geno- und phänotypischen Variation in europäischen Maissorten bezüglich AM-vermittelter Wachstumssteigerung und Phosphataufnahme unter P-Mangel
- Identifizierung optimal AM-responsiver Sorten unter kontrollierten Bedingungen

5 Ergebnisse und Diskussion

5.1 Phänotypisierung AM vermittelter Stresstoleranz

5.1.1 Durchgeführte Versuche und Arbeiten

In den Sommerhalbjahren 2016 und 2017 wurden in Kooperation mit dem Institut für Pflanzenzüchtung der TU München je zwei Feldversuche zur Charakterisierung der EU NAM Elternlinien (Tabelle 2, Anhang) durchgeführt; je ein Versuch mit guter Nährstoffversorgung, offener Beregnung und praxisüblichen Feldbedingungen („Vergleichs-Feld“), und je ein Versuch unter Trockenstress, der in einem automatischen Rollhaus als Regenschutz für eine kontrollierte Bewässerung erzeugt wurde („Trockenstress“). Im zweiten und dritten Projektjahr (2017 und 2018) wurde zusätzlich je ein Versuch unter niedriger Boden-Phosphorverfügbarkeit („niedrig-P“) sowie im Vergleichs-Feld durchgeführt, um die AM-Antwort der Maislinien unter Bedingungen zu testen, unter welchen die Phosphatzufuhr durch AM besonders bedeutsam für die Produktivität der Pflanzen ist.

Im offen berechneten Vergleichs-Feld mit praxisüblichen Wuchsbedingungen wurden über zwei Jahre 20 Elternlinien der Flint- und Dent-Genpools und 9 zusätzliche Vergleichs-Sorten angebaut (Tabelle 1, Anhang). Neu gegenüber 2016 war im Jahr 2017 eine Vergleichsmutante im dem genetischen Hintergrund der Linie „W22“, die im Gen *CASTOR* (in Mais *HUN1* genannt) eine Mutation aufweist (*hun1-1*). Dieses Gen ist für die Ausbildung der Symbiose-Bildung zentral [18]. Zum Vergleich wurde eine segregierende Wildtyp-Linie verwendet (*HUN1-1*). Die Erwartung war, dass in *hun1-1* die Besiedelung der Wurzeln durch AM Pilze gestört sein sollte. Die *hun1-1* Mutante sollte daher als nicht-mykorrhizierbare Vergleichs-Linie dienen. Die *hun1-1* Linie wurde von Dr. Ruairidh Sawers vom LANGE BIO Labor, Mexiko, bereitgestellt.

Im Vergleichs- Feldversuch 2017 wurden zusätzlich zwei Linien (R-9, R-37) mit unterschiedlicher Sekretion des pflanzlichen Abwehrstoffes Benzoxaxionid, der potentiell auch das Bodenleben des Wurzelraumes beeinflusst, in Kooperation mit dem Institut für Pflanzenzüchtung der TU München, angebaut. Die erhaltenen Daten zu Pflanzenwachstum und Wurzel-Besiedelung mit AM- Strukturen wurden dem Kooperationspartner zur weitergehenden Auswertung zur Verfügung gestellt.

In den Versuchen 2017 und 2018 wurde je ein komplettes Set der Genotypen durch Zugabe von Pilzsporen in die offene Saatzfurche mit dem AM Pilz *Rhizophagus irregularis* inokuliert, während ein zweites Set als Kontrolle mit der gleichen Menge Wasser behandelt wurde. Eine Versuchseinheit war jeweils eine Pflanzreihe zu 10 Pflanzen, in dreifacher Wiederholung pro Behandlung. Die Versuchsflächen wurden mit praxisüblichen Mengen Stickstoff und Kalium, nicht jedoch mit Phosphat gedüngt. Gegenüber den Versuchen im Jahr 2016 wurde bei der AM-Inokulierung die Menge der Sporen pro Pflanze von 500 auf 900 Sporen erhöht, und der Zeitpunkt mit der Inokulierung bei Aussaat um 30 Tage vorgezogen.

Im ersten Versuchsjahr wurden die Sporen in den Wurzelraum 30 Tage alter Pflanzen injiziert.

Auch der Trockenstressversuch wurde zur Festigung der Ergebnisse im zweiten Versuchsjahr wiederholt, aus Kapazitätsgründen jedoch von zuvor 11 NAM Eltern-Linien des Dent-Genpools und fünf Kontrollsorten auf eine Unterauswahl von fünf Elternlinien und drei Vergleichs-Sorten begrenzt (Tabelle 1, Anhang). Diese Linien wurden aufgrund ihrer positiven (D06, EC169, PH207), negativen (D09) oder neutralen Reaktion auf AM- Behandlung (UH304) im Trockenstress-Versuch 2016 zur weiteren Untersuchung ausgewählt.

Um festzustellen, wie die Maislinien unter sehr niedriger Phosphatverfügbarkeit auf Inokulation mit *Rhizophagus irregularis* reagieren, wurde in den Jahren 2017 und 2018 zusätzliche Versuche auf einer Fläche mit niedrigem pflanzenverfügbarem P-Niveau der untersten Versorgungsstufe „A“ (Tabelle 3, Anhang) durchgeführt. Hier wurden die 11 Dent-Linien des Vorjahres zusammen mit den fünf Vergleichssorten (das „Kernset“ von Genotypen, Tabelle 1) auf die AM-Responsivität unter niedrig-P Bedingungen untersucht.

Über die Saison hinweg wurden neben regelmäßigen Messungen der Wuchshöhe und des Entwicklungsstadiums Parameter zum Pflanzenwachstum und -status wie Keimrate, Jugendentwicklung, Chlorophyllgehalt (SPAD), Blattrollen unter Trockenstress, Wuchshöhe, Kornertrag und Korngewicht aufgenommen. Gegenüber den Versuchen im ersten Jahr wurden in den Folgejahren zusätzlich Parameter zur Biomasse-Produktion in die Untersuchung mit aufgenommen, da dies nach der Erfahrung des ersten Jahres als Parameter der pflanzlichen Produktivität zuverlässiger erschien als die Wuchshöhe, wenn auch die Biomasse aufwändiger zu bestimmen ist.

Zusätzlich wurden von jeder Parzelle zur Zeit der weiblichen Blüte je fünf Proben der Kolbenblätter genommen. Diese werden derzeit in Kooperation mit dem Institut für Pflanzenernährung der TU München sowie dem Lehrstuhl von Professor Kopriva am Institut für Botanik der Universität Köln auf ihren Phosphat- und Nährstoffgehalt hin analysiert.

Weiterhin wurden von allen (2016 und 2018) oder von ausgewählten Parzellen (2017) zur Blütezeit Wurzelproben genommen. Diese werden derzeit zur Feststellung der quantitativen Kolonisierung mit AM Pilzen mit mikroskopischen und molekularbiologischen Methoden analysiert.

Eine Analyse der Körnerproben auf den ^{13}C Gehalt als Indiz für die Wassernutzungseffizienz wird derzeit ebenfalls, in Kooperation mit dem Institut für Grünlandlehre der TU München, durchgeführt. Wegen der aufwändigen Probenaufarbeitung, kann sie erst im Frühjahr des Jahres 2019 abgeschlossen werden. Die Wassernutzungseffizienz ist ein wichtiger Parameter, der zum Überleben langer Trockenperioden, wie sie aufgrund des Klimawandels wahrscheinlich in Zukunft häufiger auftreten werden, beiträgt.

Witterungsbedingungen der Versuchsjahre:

Der Sommer 2016 war gekennzeichnet durch einen überdurchschnittlichen Niederschlag und durchschnittliche Temperaturen, mit einer Trockenphase nach Aussaat Anfang Mai, häufigem Niederschlag und kühlen Abschnitten im Juni, und häufigen Wechseln zwischen Trocken- und Nassphasen im August.

Das Frühjahr 2017 war besonders im März und April wärmer und trockener als im Jahresmittel, mit einer Trockenperiode nach Aussaat Mitte Mai bis Mitte Juni, sowie Mitte Juli und Mitte August, und teilweise starken Niederschlägen im Juli. Im Versuchsgebiet war über die Sommermonate 2017 eine negative Wasserbilanz zwischen Niederschlägen und Verdunstung zu verzeichnen.

Das Frühjahr 2018 war im April und Mai überdurchschnittlich warm, und in diesem Zeitraum herrschte ein Wasserdefizit, besonders in den ersten zwei Mai-Wochen nach Aussaat. Im Mai lag die nutzbare Bodenfeuchte in Bayern bei nur 49%. Der Sommer 2018 war bestimmt von langen Trockenphasen mit hohen Temperaturen, besonders in der ersten Augushälfte. [Quellen: Deutscher Wetterdienst; Wetterdaten Versuchsstation Dürnast]

5.1.2 Ergebnisse

Als wichtige Parameter für die pflanzliche Produktivität werden hier im Folgenden aus Platzgründen vorrangig die Daten für Biomasse- und Kornertrag präsentiert. Für die bessere Lesbarkeit der Ergebnisse wird auf eine komplexe Darstellung der statistischen Analyse verzichtet. Die Ergebnisse der statistischen Analyse werden in den geplanten Publikationen gezeigt werden.

Für die Trockenstressversuche als auch die niedrig-P Versuche ergibt sich über alle Versuchsjahre für die meisten Parameter eine signifikante Einbuße im Vergleich zum Feldversuch, was auf eine erfolgreiche Erzeugung von Stressbedingungen in diesen Versuchen hinweist. Der Vergleich zwischen den Versuchsmittelwerten der verschiedenen Umwelten, Jahren und Behandlungen ist in Abb. 3 im Anhang dargestellt.

Für den Kornertrag in den Trockenstressversuchen ergab sich in den Versuchsmittelwerten folgendes Muster: im Trockenstressversuch 2016 zeigte sich eine deutliche Steigerung von + 25,5 % im Kornertrag im Mittelwert aller mit AM Pilz behandelte Genotypen. Dieser Durchschnitts-Effekt ließ sich mit einer reduzierten Anzahl von Genotypen im nächsten Versuchsjahr 2017 jedoch nicht bestätigen, was zeigt, dass die Effekte auch von der Witterung abhängen.

Die Kornerträge im Vergleichs- Feld steigerten sich jährlich von 2016 bis 2018. Im Versuchsmittelwert über alle Genotypen zeigten sich aber keine deutlichen Unterschiede zwischen mit AM Pilz behandelten Pflanzen und Kontrollpflanzen.

Für die Versuche unter niedrig-P Bedingungen in den Jahren 2017 und 2018 ergaben sich gegenüber dem mit Phosphat hoch versorgten Vergleichs- Feldversuch im Versuchsmittelwert deutlich reduzierte Korn- und Biomasseerträge. Hier zeigte sich 2017 für die Behandlung mit AM Pilz im Versuchsmittelwert aller Genotypen eine deutliche Ertragssteigerung von + 17,5 % Kornertrag pro Pflanze. Dieses Ergebnis ließ sich im Folgejahr mit einer erneuten Ertragssteigerung von + 6,3 % durch AM-Behandlung bestätigen (Abb. 3, Anhang). Dies zeigt, dass die AM Symbiose den Kornertrag besonders unter P-Mangelbedingungen erhöht.

Im Trockenstressversuch 2016 ergab die Behandlung mit AM Sporen auf das Mittel der Genotypen eine deutliche Steigerung im Kornertrag. Bei Betrachtung der einzelnen Linien hoben sich hier besonders die Linien F353, D06, W117, Oh43, Mo17, PH207, W22, EC169 und F618 durch eine positive AM- Antwort hervor. Wegen schlechter Keimung der Linien F353 im Jahr 2016 stehen für diese Linie im Trockenstressversuch nur statistische unzuverlässige Daten von nur einer Parzelle pro Behandlung zur Verfügung. Für die einzelnen Mais-Linien im Trockenstressversuch im Folgejahr 2017 zeigte sich bei den Linien F353,

D06, PH207 und EC169 eine Steigerung in Biomasse-Ertrag durch AM-Behandlung, während für Kornertag nur F353, D09 und PH207 diesen Trend zeigten. Dabei zeigten die Linien F353 und –in geringerem Ausmaß– PH207 unter Trockenstress diesen Trend stabil über beide Versuchsjahre hinweg (Abb. 4, Anhang).

Im mit Wasser und Phosphat gut versorgten Vergleichs- Feld führte die AM- Behandlung im Versuchsmittel aller Genotypen über alle drei Versuchsjahre zu keinen deutlichen Wachstumszuwächsen. Einzelne Genotypen zeigten in verschiedenen Jahren aber dennoch eine Ertragssteigerung nach AM-Behandlung. Stabil über mehrere Jahre zeigten diese Tendenz im Dent-Genpool die EU NAM Linien und amerikanischen Vergleichssorten B73 und UH304 (je drei Jahre), EC169, PH207, und W22 (je zwei Jahre), sowie im Flint-Genpool DK105 und F03802 (je zwei Jahre) (Abb. 5, Abb. 6, Anhang).

Die *hun1-1* Mutante von Linie W22 (Wildtyp- Allel *HUN1-1*) war als nicht mykorrhizierbarer Vergleichs-genotyp in die Trockenstress- und Vergleichsversuche 2017 aufgenommen worden. Hier zeigte sich in beiden Umwelten eine deutlicher Minderertrag der Mutante bei Korn und Biomasse im Vergleich zum isogenen Wildtyp (Abb. 4 bis Abb. 6, Anhang), was zeigt dass eine funktionierende Symbiose zum Kornertag beiträgt. Bei der Analyse der Wurzelproben beider Genotypen auf kolonisierende AM- Strukturen zeigte jedoch die Mutante an beiden Versuchsorten unerwarteter Weise eine ähnliche hohe Kolonisierungsdichte im Vergleich zum isogenen Wildtyp (Abb. 10). Ob hier eine Pufferung im Phänotyp durch genetische Redundanz vorliegt, oder ob mögliche Veränderungen an den AM-Strukturen in den Wurzeln anders erfasst werden müssen wird weiterhin untersucht. Es ist möglich, dass bei hoher Sporendichte im Boden AM Pilze die *hun1* Mutante besiedeln können, aber dass der Nährstofftransfer aufgrund der Mutation nicht vollständig funktioniert.

In den niedrig-P Feldversuchen 2017 und 2018 zeigte die Behandlung mit AM-Sporen ihren deutlichsten Effekt auf den Kornertag der Mais-Linien. Hier profitierten gemäß den Versuchstrends im Mittelwert besonders viele Genotypen. Vor Allem die Linien Oh7b, F618, UH304, Mo17 und W22 zeigten nach der AM-Behandlung Biomasse- Zuwächse (Abb. 8, Anhang). Parallel dazu wirkte sich die AM-Behandlung auf die gleichen Linien auch beim Kornertag durchgehend über beide Versuchsjahre positiv aus (Abb. 7, Anhang).

Die Kolonisierung der Wurzeln mit Pilzhyphen, Arbuskeln und Vesikeln ist als Mittelwert aller Genotypen der einzelnen Versuche 2016 und 2017 in Abb. 9 im Anhang dargestellt, und zeigt mit 60 % bis 85 % mit Hyphen kolonisierten Wurzelabschnitten eine erfolgreiche Kolonisierung aller Mais-Genotypen an. Interessanter Weise war unter Trockenstress tendenziell eine etwas erhöhte Kolonisierungsdichte gegenüber Vergleichs-Feld und niedrig-P Feld zu verzeichnen. Auffällig war, dass auch unbehandelte Kontroll- Pflanzen zu einem hohen Grad durch natürliche vorkommende AM- Pilze besiedelt waren.

Für die Wurzelkolonisierung einzelner Genotypen soll hier exemplarisch das Versuchsjahr 2017 genauer analysiert werden, da im zweiten Versuchsjahr alle drei Feldtypen-Trockenstress, Vergleichs-Feld, und niedrig-P Feld- parallel angebaut waren. Im Trockenstressversuch ergab sich 2017 im Mittel eine um 4 % nur leicht erhöhte Besiedelungsdichte im AM-Behandelten Teil des Versuches gegenüber der unbehandelten Kontrolle. Die Genotypen D06 und D09 erfuhren hier mit 8 % bzw. 12 % den größten Besiedelungs-Zuwachs nach Inokulierung, während UH304 und EC169 um 2 – 4 % geringer besiedelt wurden (Abb.

10, Anhang). Diese geringere Wurzelkolonisierung deckte sich im Fall von UH304 und EC169 mit einer Einbuße im Kornertrag, bzw. bei D09 mit einem erhöhten Kornertrag bei höherem Kolonisierungsgrad, D06 zeigte jedoch einen gegenläufigen Trend.

Im Vergleichs-Feldversuch hingegen ergab sich eine im Durchschnitt 5 – 8 % geringere Kolonisierungsdichte der Wurzeln zwischen AM-Behandlung und Kontrollgruppe. Ausnahmen hiervon waren die Linien D06 und F353, die eine Zunahme der Kolonisierungsdichte um 11 % bzw. 6 % zeigten (Abb. 10, Anhang). Dieser ging bei D06 erneut mit leicht reduziertem Kornertrag einher, während F353 keine eindeutige Veränderung zeigte.

Im niedrig-P Feld war zwischen den Behandlungen in der Kolonisierungsdichte im Gegensatz zum Kornertrag kein deutlicher Unterschied festzustellen, jedoch zeigten D09 und F353 mit 16 % und 14 % den höchsten Kolonisierungszuwachs nach AM-Behandlung (Abb. 10, Anhang). Diese beiden Linien profitierten in diesem Versuch von der AM-Behandlung ebenfalls durch einen erhöhten Ertrag.

Sobald alle Daten zur Wurzelkolonisierung mit den verschiedenen Pilzstrukturen komplett vorliegen werden diese mit den Leistungsdaten der einzelnen Versuchsglieder in Zusammenhang gesetzt werden um einen möglichen Zusammenhang zwischen Wurzelkolonisierungsdichte und pflanzlicher Produktivität weiter aufzuklären.

Die Analyse der Phosphor-Gehalte in Blatt- und Kornproben aus dem Trockenstress- und Vergleichs-Feldversuch 2016 ergab für die Blattproben mit $3,4 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ P-Gehalt im Vergleichs-Feld und $2,6 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ P im Trockenstressversuch deutliche Unterschiede zwischen den Versuchsorten. Für die Korn P-Gehalte wiederholte sich dieses Ergebnis mit $2,3 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ im Vergleichs-Feld zu $1,9 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ P im Trockenstressversuch. Obwohl die Bodenverfügbarkeit von Phosphat an beiden Standorten hoch war, und im Trockenstressversuch sogar etwas höher als im Vergleichs-Feld, wiesen die Pflanzen unter Trockenstress geringere P-Gewebekonzentrationen auf. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die geringere Wasseraufnahme unter Trockenstress eventuell ebenfalls eine geringere Phosphor-Aufnahme bedingt und sich beide Stressarten kumulieren könnten.

Die niedrigeren Gewebe P-Konzentrationen der Pflanzen spiegelten den deutlich reduzierten Kornertrag zwischen Feld- und Trockenstressversuch wieder. Für die Korn P-Gehalte ergab sich im Versuchsmittel für den Vergleichs-Feldversuch eine Reduzierung von 12 % in AM-Behandelten Pflanzen gegenüber Kontrollpflanzen, während sich im niedrig-P Versuch eine Steigerung von 6 % ergab. Von sechs Genotypen die im Trockenstressversuch einen erhöhten Korn P-Gehalt nach AM-Behandlung aufwiesen zeigten fünf Genotypen ebenfalls einen parallel gesteigerten Kornertrag; F353, UH007, Mo17, Oh43 und W117. Im Vergleichs-Feldversuch gab es unter sieben Linien mit erhöhtem Kornertrag durch AM-Behandlung hingegen nur eine Übereinstimmung mit gleichzeitig erhöhtem Korn P-Gehalt; in der Elternlinie F353.

Die Blatt-P Gehalte der Versuche im Jahr 2016 wiesen einen deutlicheren Unterschied zwischen Vergleichs-Feld und Trockenstressversuch auf als die der Korn-Proben. Dennoch zeigten von drei Genotypen mit erhöhtem Blatt-P Gehalt (B73, PH207, und F618) nur PH207 und F618 auch im Kornertrag eine Ertragssteigerung im Trockenstressversuch.

Im Feldversuch führte bei sechs Genotypen mit erhöhtem Blatt-P Gehalt dieser nur bei F353 und UH304 zu erhöhtem Kornertrag. Diese Ergebnisse müssen in den Gewebe-Proben der Folgeversuche noch bestätigt werden, könnten aber einen ersten Hinweis darauf liefern, dass AM- Behandlung besonders unter geringerer Wasserverfügbarkeit die P-Aufnahme der Pflanzen verbessern kann.

Das Hauptinteresse dieser Studie liegt auf den Unterschieden in der AM-Antwort zwischen verschiedenen Mais-Linien. Hier beobachteten wir für die Haupteffekte Wasserversorgung, P-Versorgung, AM-Behandlung und Genotyp abhängig von Versuchsfeld und erfasstem Parameter deutliche Unterschiede zwischen den Linien (Abb. 3-8; Anhang). Für einige der Linien erfassten wir eine Tendenz zu einer stabilen AM-Antwort in Biomasse- und Kornertrag über die mehrjährigen Versuche in einer bestimmten Testumwelt hinweg. Andere Linien hingegen zeigten eine stärkere Variabilität angesichts geänderter Umwelteinflüsse zwischen den Jahren. In den Trockenstressversuchen heben sich zum Beispiel F353 und PH207 durch eine stabile zweijährige AM-Responsivität ab. In den Versuchen im Vergleichsfeld hingegen zeigten B73 und UH304 stabile AM-Responsivität über alle drei Versuchsjahre, und EC169, PH207 und W22 über zwei Jahre hinweg. In den niedrig-P Versuchen zeichneten sich Oh7b, F618, UH304, Mo17 und W22 durch stabile zweijährige AM-Responsivität aus.

In der Schnittmenge aller Feldversuche waren PH207, UH304, und W22 besonders oft unter den als AM-responsiv identifizierten Genotypen.

5.1.3 Diskussion

Unsere Feldexperimente zeigten, dass - trotz Anwesenheit von natürlichen AM-Pilzen im Feld - die zusätzliche AM-Inokulierung besonders unter Trockenstress und niedriger Phosphatversorgung einen positiven Einfluss auf die Produktivität einiger Mais-Linien haben kann. Es ergaben sich individuelle Unterschiede in der AM-Antwort verschiedener Mais-Linien, mit positivem und negativem Effekt, die Hinweise auf eine genetische Veranlagung zur AM- Antwort im verwendeten Sortiment europäischer Maislinien geben.

Für die Trockenstressversuche als auch die niedrig-P Versuche ergab sich über alle Versuchsjahre für die meisten Parameter eine signifikante Einbuße im Vergleich zum Feldversuch, was auf eine erfolgreiche Erzeugung von Stressbedingungen in den Versuchen hinweist. In der geänderten Rangfolge im Ertrag der Kontrollpflanzen zwischen den Versuchsumwelten zeigten sich deutliche Unterschiede in der Stressanfälligkeit der einzelnen Linien *per se*.

Unterschiede ergaben sich auch in der individuellen Reaktion auf die AM-Behandlung unter verschiedenen Stress-Faktoren. Dabei zeigten besonders die Genotypen F353 und PH207 unter Trockenstress über zwei Jahre hinweg Zuwächse im Kornertrag unter AM-Behandlung, während unter P-Mangel insbesondere die Linien Oh7b, F618, UH304, Mo17 und W22 von der AM-Behandlung profitierten (Abb. 4-8, Anhang). Dies weist auf eine Genotyp x Umwelt Interaktion hin. Über alle Feldversuche hinweg waren PH207, UH304, und W22 besonders oft unter den als AM- responsiv identifizierten Genotypen. Dies könnte wiederum einen Hinweis geben auf eine gewisse genetische Stabilität dieser Linien in der Nutzung der AM-Symbiose mit *Rhizophagus irregularis* Inokulum über verschiedene Umwelten hinweg.

In Bezug auf die beobachtete Variabilität einiger Linien in der AM-Antwort über die Versuchsjahre am selben Ort hinweg ist wichtig zu bemerken, dass der Sommer 2016 eher kühl und regnerisch und die Sommer 2017 und 2018 warm bis heiß und sonnig waren. Es war zu erwarten, dass sich diese Unterschiede in der Witterung auf Pflanzenwachstum und Ertrag und gegebenenfalls auch auf die AM-Responsivität einzelner Maislinien in mehrjährigen Versuchen in einer verstärkten Genotyp x Umwelt x Jahr Interaktion auswirken.

In den ersten zwei Versuchsjahren zeigte sich, dass die zur Verfügung stehenden Felder über eine gesunde Population von arbuskulären Mykorrhiza Pilzen verfügen. Unsere Analysen ergaben oft, dass zum Zeitpunkt der Probennahme die Wurzeln der nicht-inokulierten Kontrollpflanzen ähnlich stark mit AM-Pilzstrukturen kolonisiert waren wie die der inokulierten Pflanzen (Abb. 9, Anhang).

Die mittlere Besiedelungsdichte der Wurzeln in den Trockenstress- Versuchen war gegenüber den Feldversuchen mit konventionellen Bedingungen deutlich erhöht. Dies könnte einen ersten Hinweis auf die besondere Bedeutung der Mykorrhiza unter Trockenstressbedingungen geben.

Die gesunde Pilzpopulation im Boden führte mit großer Wahrscheinlichkeit zu einer partiellen Maskierung des positiven Effekts der eingebrachten AM-Sporen. Dies wird deutlich wenn man den Unterschied zum kontrollierten Gewächshausversuch betrachtet. Des Weiteren zeigten Analysen des Bodens im Vergleichs-Feld und im Feld für den Trockenstressversuch eine gute Phosphorversorgung an (Tabelle 3, Anhang). Gerade unter hohen Bodenphosphat-Gehalten kann eine positive AM-Antwort maskiert werden oder sich sogar ins Negative verkehren [19]. Trotzdem reagierten einige Maislinien, besonders unter Trockenstress- und niedrig-P Bedingungen, positiv auf die zusätzliche Inokulation mit AM-Sporen, was auf eine gute AM-Responsivität unter diesen Bedingungen und einen positiven Effekt der AM Inokulierung unter Stressbedingungen hinweist. Es wird nun in einem Folgeprojekt wichtig sein, festzustellen, ob die eingebrachten *Rhizophagus irregularis* Sporen zu einer Verschiebung der Artenzusammensetzung der besiedelnden AM Pilze führten. Da unterschiedliche Pilzspezies unterschiedlich nützlich für die Pflanze sind, könnte sich eine Verschiebung des Artenspektrums trotz gleichbleibender quantitativer Wurzelbesiedlung auf Pflanzenwachstum und Ertrag auswirken. Wir planen dies durch eine meta-genomische Analyse der AM-Pilze in Wurzelproben, welche schon gesammelt wurden, zu analysieren.

Die Ergebnisse der verschiedenen Versuche bedürfen der Bestätigung in zusätzlichen Experimenten, müssen statistisch untermauert werden, und werden mit den Daten der Wurzelkolonisierung und der Blatt-Nährstoffgehalte in Zusammenhang gesetzt werden, um zugrundeliegende Wirkmechanismen weiter aufzuklären.

Die Stabile AM-Antwort verschiedener Linien unter den verschiedenen Stress-Bedingungen und über mehrere Jahre hinweg zeigt, dass durch AM-Behandlung die Leistungsfähigkeit der Pflanzen unter Stressbedingungen erhöht werden kann, und dass einige Linien, wie erhofft, besonders gut reagieren.

Die Identifizierung der genetischen Variation für die AM-Responsivität zwischen Mais-Linien unter verschiedenen Stress- Bedingungen ist eine wichtige Grundlage zur weiteren zukünftigen Aufklärung und Nutzbarmachung zugrundeliegender genetischer Faktoren. Die Aufklärung beständiger genetischer Unterschiede, welche sowohl die AM-Antwort als auch

die intrinsische Trockenstress- und Phosphatmangelresistenz verschiedener Mais-Linien bedingen, sind für die Mais-Züchtung und Landwirtschaft wichtige Ergebnisse für die Anpassung an mögliche Klimaveränderungen. Neben der AM-Antwort werden auch die intrinsischen Unterschiede in der Trockenstress- und Phosphatmangelresistenz zwischen den Maislinien unabhängig von AM weiter analysiert.

Insgesamt wurde die interessante Beobachtung gemacht, dass die AM-Responsivität sowohl von Genotyp als auch von der Umwelt („Environment“) abhängt (G x E Interaktion). Damit folgt die AM-Responsivität einem ähnlichen Muster, wie andere züchterisch interessante Merkmale. Dass unterschiedliche Linien unter verschiedenen Stressbedingungen auf AM positiv reagieren, weist darauf hin, dass die Antwortfähigkeit auf AM unter Trocken- und Phosphatmangelstress wahrscheinlich auf unterschiedlichen genetischen Grundlagen beruht. Die als AM-responsiv identifizierten Linien und ihre Kompatibilität in der Symbiose mit AM können in Zukunft ein gutes Ausgangsmaterial für die Züchtung klimaresistenter, gut angepasster und optimal AM-responsiver Sorten darstellen.

5.2 Automatisierte Phänotypisierung

5.2.1 Durchgeführte Versuche und Arbeiten

In Vorarbeiten der ersten Projektjahre wurden verschiedene Kultursubstrate auf ihre Eignung als Testsystem zur Darstellung der AM-Responsivität in Mais getestet. Dabei wurde eine Mischung aus neun Teilen Quarzsand und einem Teil gemahlener, getrockneter Baulehm als geeignetes und in großen Mengen gut zu verarbeitendes Substrat identifiziert. Dies ermöglichte im dritten Versuchsjahr in einer Kooperation mit Herrn Dr. Herz vom Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft (LfL) die Durchführung eines umfangreichen Topfversuchs auf einer automatisierten LemnaTec Gewächshaus-Versuchsanlage.

Hierfür wurden das Kernset von 11 ausgewählten Dent-Linien und fünf Vergleichsorten in sechsfacher Wiederholung sowohl mit- als auch ohne AM-Behandlung in Einzeltöpfen von 10l Volumen angebaut und regelmäßig per automatisierter Bildaufnahme (Abb. 11, Abb. 12, Anhang) als auch manueller Datenaufnahme phänotypisiert. Die Nährstoffversorgung wurde über drei Düngetermine sichergestellt und so berechnet, dass eine hinreichende Versorgung mit Makro- und Mikro- Nährelementen, aber eine nur geringe Versorgung mit Phosphor, gewährleistet war. Die automatische Bewässerungsanlage bewässerte die Töpfe mehrmals täglich nach Gewicht auf ca. 72 % der maximalen Wasserhaltefähigkeit des Substrates und stellte damit eine ausreichende und gleichzeitig kontrolliert-konstante Wasserversorgung der Pflanzen sicher. Zur Erhöhung der Versuchspräzision wechselten die auf beweglichen Plattformen gelagerten Pflanzen mehrmals täglich den Standort im Gewächshaus und Standplatz-Effekte zu vermeiden.

Pro Aufnahmetag wurden Fotos von allen vier Seiten pro Pflanze aufgenommen, und aus den gemittelten Daten wurde die gesamte Spross-Oberfläche als auch der Anteil grüner Pflanzenteile an der gesamten Sprossoberfläche pro Pflanze errechnet (Abb. 13 und Abb. 14, Anhang).

Am Ende des Experiments wurden aus jedem Topf Bodenproben entnommen zur späteren Bestimmung von enthaltenem AM Pilzmyzel. Ab Tag 69 nach Aussaat wurden die Pflanzen geerntet, die Wurzel-Ballen vom Substrat gereinigt und Spross- und Wurzelrockenmasse bestimmt. Es wurden jeweils Proben zur weiteren Analyse von Wurzeln und Spross genommen zur Bestimmung der Kolonisierungsdichte der Wurzeln, beziehungsweise der Nährstoffgehalte der oberirdischen Biomasse.

5.2.2 Ergebnisse

Die nicht-invasiven Kameraaufnahmen erlaubten eine Aufnahme des Wachstums der Maispflanzen über die Dauer des Versuches hinweg (Abb. 13, Anhang). Nach 40 Tagen war eine eindeutige Wachstumssteigerung durch AM klar zu erkennen und konnte gut quantifiziert werden. Ebenso zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen den Maislinien im Wachstum allgemein und insbesondere in der AM- vermittelten Wachstumssteigerung. Dieses kontrollierte Kultursystem eignet sich daher ideal für die Erfassung von Wachstumsunterschieden im Mais und für die Kartierung der genetischen Unterschiede, welche die Wachstumsunterschiede bedingen.

Passend zu den starken AM-Effekten ergab eine erste Analyse der Wurzelproben bei fast allen inokulierten Pflanzen eine dichte Besiedlung mit Pilzhyphen von 70 bis 90 % der untersuchten Abschnitte, während Kontrollpflanzen bis auf wenige Ausnahmen frei von AM-Strukturen in den Wurzeln waren. Vier Kontrollpflanzen, die unerwarteter Weise voll kolonisiert waren, gehen vermutlich auf Fehler bei der Anlage des Experimentes zurück. Da sich diese Pflanzen genau wie Ihre Inokulierten Gegenstücke verhielten wurden sie in den Abbildungen Abb. 13 und Abb. 14 als „Wiederholung 7“ gekennzeichnet, und im Folgenden als AM-Behandelte Pflanzen ausgewertet. Einzelne inokulierte Pflanzen die mit 20 % bis 60 % weniger dicht besiedelte Wurzelsysteme aufwiesen zeigten oft auch eine geringere Wachstumssteigerung als dichter besiedelte Gegenstücke; dies war besonders bei den Linien UH250, UH007, und B73 zu beobachten (Abb. 13 bis Abb. 15, Anhang).

Die durch Bildauswertung gewonnenen Daten zur fotografierten Oberfläche der Versuchspflanzen decken sich gut mit den Daten der finalen Biomasse der Pflanzen, und geben somit das Pflanzenwachstum verlässlich wieder. So zeigten die Linien F618, D06, Oh7b, EC169, Mo17, Oh43, W22, und B73 deutlich höhere Spross-Oberflächen nach Inokulierung mit AM, während Pflanzen ohne AM deutlich im Wachstum zurückblieben (Abb. 13, Anhang). Dies drückte sich auch stark in den gemessenen Biomasse-Ertragssteigerungen gegenüber Kontrollpflanzen von 258% (B73) bis 377% (EC169) und 668% (D06) aus (Abb. 15, Anhang). Demgegenüber zeigten besonders die zentralen Kreuzungseltern der EU NAM Populationen, UH007 und F353, sowie die Linien UH304, UH250, und F252, geringere Wachstumssteigerungen durch AM, und geringere Gewichtszuwächse bei der Biomasse (Abb. 13, Abb. 15, Anhang). Die Rangfolge der Genotypen Anhand der Oberfläche der Kontrollpflanzen (in Abb. 13) bzw. der Biomasse (in Abb. 15) zeigte ebenfalls deutliche Unterschiede im Wachstum der verschiedenen Genotypen ohne Mykorrhiza-Symbiosepartner auf. Hier zeigten Genotypen mit hoher Grundproduktivität auch oft maximale Wachstumswerte unter Symbiose mit AM.

Zusätzlich zur Auswertung der gesamten pflanzlichen Oberfläche wurde auch eine differenzierte Auswertung der Bilddateien für den prozentualen Flächenanteil der Grüntöne

produktiver Pflanzenteile, im Gegensatz zu den Brauntönen seneszenten Pflanzenteile, durchgeführt. Auch hier zeigte sich über alle Genotypen hinweg ein deutlich gesteigerter Anteil photosynthetisch produktiven Gewebes in den mit AM inokulierten Pflanzen gegenüber den Kontrollpflanzen, ebenso wie genotypische Unterschiede der Maislinien in der Antwort auf die AM- Behandlung. (Abb. 14, Anhang).

5.2.3 Diskussion

Der Topfversuch in der automatisierten LemnaTec-Anlage der LfL ist als besonders erfolgreich zu bewerten. Zum einen ermöglicht die automatisierte Versuchsdurchführung eine hohe Datenpräzision, und die Bildauswertung zur Datengewinnung ermöglicht die zeitliche Auflösung der Wachstumsdynamik der mit AM behandelten und unbehandelten Pflanzen. Zum anderen zeigten sich die Unterschiede zwischen den getesteten Mais-Linien, die Symbiose mit AM in Wachstumssteigerungen übersetzen zu können, in diesem Testsystem besonders deutlich.

Interessanter Weise deckten sich die Ergebnisse des Topfversuchs mit geringer P-Versorgung zum großen Teil mit denen der niedrig-P Feldversuche. In den niedrig-P Feldversuchen zeichneten sich Oh7b, F618, UH304, Mo17 und W22 durch stabile zweijährige AM-Responsivität aus. Mit Einschränkung für UH304 wurden diese Linien auch im Topfversuch als besonders AM-responsiv identifiziert. Dies lässt hoffen, dass sich diese Ergebnisse von einem Testsystem in das Andere übertragen lassen.

Für andere AM-responsive Maislinien des Topfversuches ergab sich im Vergleich zu den Ergebnissen im niedrig-P Feldversuch eine gewisse Genotyp- Umwelt Interaktion, da D06 und D09 im Topfversuch und im niedrig-P Versuch 2017 eine AM-Antwort zeigten, die aber im gleichen Feldversuch 2018 nicht bestätigt werden konnte. Dagegen erwies sich UH304, eine der im niedrig-P Feldversuch am stärksten AM-responsiven Genotypen, unter den Bedingungen des Topfversuchs im Vergleich zu anderen Genotypen weniger responsiv. In einer vergleichbaren publizierten Gewächshaus- Studie wurde Oh7b als weniger AM-responsiv als OH43 eingestuft [20], während Oh7b in unseren Versuchen sowohl im Feld als auch im Gewächshaus positiv auf die AM- Behandlung reagierte. Dies könnte wiederum Hinweise darauf liefern, dass auch in Topfversuchen eine gewisse Genotyp x Umwelt Interaktion zu erwarten ist und weiter untersucht werden muss.

Die Tatsache, dass einige Pflanzen, welche weniger dicht besiedelte Wurzelsysteme aufwiesen, auch weniger Wachstumssteigerung als voll kolonisierte Gegenstücke des gleichen Genotyps zeigten, könnte einen ersten Hinweis darauf liefern, dass zur Erreichung der maximalen AM-Responsivität eine dichte Besiedelung des Wurzelsystems von Vorteil ist.

Die deutlichen Unterschiede im Wachstum der verschiedenen Mais- Genotypen ohne AM- Symbiosepartner deuten auf eine unterschiedliche Effizienz in der Aufnahme und Verwertung der Nährstoffe im Substrat hin. Mit Ausnahme von EC169 sind hier vor Allem die amerikanischen Vergleichssorten hoch in der Rangfolge, während die restlichen EU NAM Linien in der unteren Hälfte der Liste zu finden sind. Ob hier eine unterschiedliche genotypische Veranlagung in der Nährstoff-Effizienz vorliegt, ob ein unterschiedlicher Blühzeitpunkt einen Einfluss hat, und welche anderen Mechanismen hier zugrunde liegen, und wie sich dies auf die AM-Responsivität auswirkt, wird anhand der Daten und Analysewerte genauer untersucht werden. Es scheint, dass eine hohe Grundproduktivität ohne AM auch oft mit maximaler Produktivität im Verbund mit dem Symbiosepartner einhergeht. Eine solche Additivi-

tät intrinsischer Wachstums- Effizienz und zusätzlicher symbiotischer Wachstumssteigerung ist zur Züchtung von an verschiedene Wachstumsbedingungen breit angepasster Sorten besonders interessant.

Mit der differentiellen Auswertung verschiedener pflanzlicher Farbtöne steht ein weiteres effizientes Werkzeug zur Verfügung um die Auswirkungen der AM-Symbiose auf die pflanzliche Leistungsfähigkeit und den Ernährungsstaus zu quantifizieren, und zugrundeliegende Mechanismen weiter aufzuklären.

Die relativ geringe AM- Antwort der zentralen Kreuzungseltern F353 und UH007 (Abb. 13, Abb. 15, Anhang) bedeutet, dass besonders Kartierungspopulationen mit stark AM-responsiven Genotypen wie D06 und EC169 als zweitem Elter ein gutes Werkzeug zur genetischen Kartierung der genetischen Polymorphismen, welche für die Unterschiede in der AM-Responsivität verantwortlich sind, darstellen. Entsprechend wurde die Saatgutvermehrung der Doppel-haploiden Populationen F353 X D06 und F353 X EC169, als Kreuzungen mit stark AM-responsiven Eltern, und F353 x UH250 als Kreuzung mit zwei Eltern von eher geringer AM-Antwort, in Auftrag gegeben.

6 Stellungnahme zum Projekterfolg

6.1 Phänotypisierung AM vermittelter Stresstoleranz

Die Versuche zum Einfluss der Inokulation verschiedener Mais-Genotypen mit der AM-Spezies *Rhizophagus irregularis* unter praxisnahen Feldbedingungen waren sehr erfolgreich und lieferten einige interessante Ergebnisse. Es konnte gezeigt werden, dass die drei unterschiedlichen Versuchsumwelten und Versuchsjahre alle einen Einfluss sowohl auf die AM-Responsivität der untersuchten Linien als auch auf die Kolonisierungsdichte der Wurzeln ausübten. Die mehrjährigen Versuche ermöglichten die Identifizierung stabil AM-responsiver Mais-Genotypen für alle Testumwelten. Es konnte erfolgreich gezeigt werden, dass Inokulation mit AM-Sporen das Wachstum und den Ertrag einiger Genotypen, insbesondere unter Trocken- und Nährstoffstress (P-Mangel), fördert. Es wurden klare Genotyp x Umwelt Interaktionen festgestellt, da F353 und PH207 stabil über zwei Jahre hinweg im Trockenstress von AM- Zugabe profitierten, während im P-Mangel vor allem UH304, Oh7b, Mo17, F618, und W22 profitierten.

Durch die praxisnahe Durchführung der Versuche unter Feldbedingungen haben die Ergebnisse dieser Feldversuche eine besonders hohe Relevanz für die direkte Anwendung in der Landwirtschaft. Somit wurde das Projektziel, unter bestimmte Stressfaktoren hilfreiche als auch stabil über verschiedene Umwelten nutzbare Mais-Mykorrhiza Interaktionen zu identifizieren, vollumfänglich erreicht.

6.2 Automatisierte Phänotypisierung

Die Ergebnisse des automatisierten Topfversuches haben unsere Erwartungen bei Weitem übertroffen. Wir konnten zeigen, dass das von uns entwickelte Testsystem bestehend aus dem Anbausystem und der automatisierten Phänotypisierungs-Plattform ideal geeignet ist um die AM-Responsivität von Mais-Genotypen darzustellen und zu quantifizieren. Zwischen den getesteten Mais-Linien konnten wir deutliche Unterschiede in der AM-Responsivität nachweisen und detailliert charakterisieren. Ideal AM-responsive Eltern-Linien des EU NAM Panels und die dazugehörigen kontrastierenden Kartierungspopulationen wurden so identifiziert.

Besonders erfreulich ist, dass von den unter niedrig-P Bedingungen sowohl im Feld- als auch im Topfversuch als AM-responsiv ermittelten Genotypen mit F618, Oh7b, W22 und Mo17 besonders viele übereinstimmen. Somit kann das kontrollierte Topfsystem die AM-Antwort der Genotypen im Feld potentiell abbilden. Durch das Fehlen von autochthonen Bodenpilzen, welche die Kontrollpflanzen kolonisieren, und das Fehlen von Positionseffekten (Pflanzen werden auf der LemnaTec Anlage bewegt) werden gegenüber den Feldversuchen allerdings größere Wachstumsunterschiede herauskristallisiert, so dass sich das System besser zum Kartieren der den Wachstumsunterschieden zugrundeliegenden genetischen Polymorphismen eignet.

Mit der Kombination aus effektivem Kultursystem und einer präzisen Versuchsmethodik steht nun ein wirkungsvolles Werkzeug für umfangreiche Versuche mit verschiedenlicher Fragestellung zum Einfluss von AM auf das Maiswachstum unter Stressbedingungen zur Verfügung. Auch weiterführende Fragestellungen zur funktionellen Kompatibilität diverser Mais-Genotypen und verschiedener AM Pilz-Spezies könnten hiermit beantwortet werden.

Die automatisierte Phänotypisierungsplattform stellt erwiesenermaßen ein optimales Werkzeug zur präzisen Phänotypisierung einer umfangreichen, segregierenden Kartierungspopulation dar, und entsprechende Kartierungspopulationen in der AM-Antwort kontrastierender Elternlinien werden derzeit für eine zukünftige genetische Kartierungsstudie vermehrt.

Die erfolgreiche Identifizierung der korrekten Versuchsbedingungen zur Erzeugung einer AM- Antwort in einem Topfversuch, sowie die eindeutige Identifizierung von in der AM Antwort kontrastierenden Genotypen, bildet zugleich die Grundlage für eine erfolgreiche Durchführung einer genetischen Transkriptions- Studie. Diese wird zur Stützung der später zu identifizierenden, der AM-Antwort zugrundeliegenden Genomabschnitte und genetischen Regulation, herangezogen. Gleichzeitig dienen die Transkriptionsdaten dazu, zu bestimmen welche Signal- und Stoffwechselwege in Antwort auf AM in unterschiedlich reagierenden Mais Linien aktiviert werden. Die Durchführung dieser Studie wird derzeit vorbereitet.

Somit wurden auch die Zielstellungen des Topfversuches, a) ein automatisches Testsystem zur Quantifizierung der AM- Antwort zu evaluieren, b) die geno- und phänotypische Variation in der AM-Antwort Europäischer Maissorten zu bestimmen und c) optimal AM-responsive Mais Genotypen unter kontrollierten Bedingungen zu bestimmen, vollständig erfüllt.

7 Nutzen der Projektergebnisse

In den mehrjährigen Feldversuchen konnten für alle Testumwelten stabil AM-responsive Mais-Genotypen identifiziert werden. Diese Linien können gezielt zur Verbesserung der AM-Responsivität von Zuchtmaterial für diese Umwelten genutzt werden. Sobald die genomischen Abschnitte, welche die unterschiedliche Antwort bestimmen, identifiziert wurden, wäre auch eine schnellere, Marker-gestützte Selektion auf diese Merkmale möglich. Dies kann zur optimalen Nutzung der AM Symbiose in neuen Maissorten dienen, um die Produktivität von Mais insbesondere unter Stressbedingungen zu erhöhen.

Ebenfalls denkbar ist die gezielte Entwicklung von umweltfreundlichen Saatbeizen für Feldbedingungen in denen die AM-Behandlung durchweg positiv Ergebnisse erzielte - in unserem Fall die niedrig-P Umwelt im Feld -, bzw. die gezielte Kombination von funktional kompatiblen AM-Saatbeizen mit dazu passenden Mais-Genotypen und Feldbedingungen.

Die zuverlässige Quantifizierung der AM-Antwort verschiedener Maislinien stellt die Grundlage zur Kartierung von genetischen Unterschieden, welche die AM-Antwort bedingen, dar. Die sichere Identifizierung AM-responsiver Maislinien ermöglicht uns nun die richtigen Kartierungspopulationen aus der Vielzahl der vorhandenen EU-NAM Populationen auszuwählen, und später die Nachkommenschaft zuverlässig zu quantifizieren und die genetische Basis der Unterschiede in der AM-Responsivität zu identifizieren. Diese kann dann in der Zukunft zur effektiven Züchtung Symbiose-optimierter Mais Sorten mittels Marker-gestützter Präzisionszucht genutzt werden.

Die hier erprobte automatisierte Phänotypisierungsmethodik kann zukünftig auch genutzt werden, um Zuchtmaterial direkt auf seine funktionelle Kompatibilität mit verschiedenen AM-Spezies zu testen, und anhand der Ergebnisse gezielt zu kreuzen oder mit dem optimalen Symbiosepartner zu kombinieren.

8 Die Projektergebnisse in Bezug zum Klimawandel

Unsere Feldversuche haben gezeigt, dass die Ausbringung von Sporen von *Rhizophagus irregularis* im Feld besonders unter Trockenstress und unter niedriger P- Verfügbarkeit geeignet sein kann die Erträge von Mais merklich zu erhöhen.

Eine erbliche genetische Veranlagung zur AM-Responsivität unter Trockenstress erlaubt die Züchtung von optimal an Mykorrhiza-Symbiose angepasste Mais-Sorten, welche durch AM Inokulation besser gegen unerwartete Trockenheitsereignisse geschützt werden können.

Wir beobachteten außerdem, dass unter Trockenstress im ersten Jahr auch geringere Konzentrationen an Phosphor in Korn- und Blattproben gegenüber dem Vergleichsversuch eingelagert wurden. Trockenstress scheint daher auch zu geringerer Mineralstoff-Verfügbarkeit im Korn beizutragen und damit den Nährwert von Mais (und möglicherweise auch andere Getreiden) zu vermindern. Inokulation mit AM führte in einigen Linien zur Erhöhung der P-Akkumulation im Korn. Dies zeigt, dass AM auch den Nährwert des Kornes unter Stressbedingungen zumindest teilweise und in einigen Linien erhalten kann.

Sollten sich diese Ergebnisse untermauern lassen wäre eine Saatgut-Behandlung mit AM-Sporen als ökologisch nachhaltiges Pflanzenstärkungsmittel für AM-responsive Maissorten für Trockenstress- Bedingungen einsetzbar.

Phosphat ist eine endliche Ressource mit weltweit nur wenigen abbauwürdigen Lagerstätten. Der Abbau sowie die spätere Verarbeitung zu Düngemitteln belastet das Klima durch umweltbelastenden Bergbau, bei dem große Mengen an Treibhausgasen ausgestoßen werden, sowie durch sehr energieintensive Verarbeitungsprozesse. Die Auswaschung von Phosphat aus landwirtschaftlichen Flächen in oberflächliche Wasserkörper kann dort Algenblüten mit vermehrtem Ausstoß von Treibhausgasen zur Folge haben, welche sich wiederum negativ auf das Klima auswirken.

Unsere Versuchsergebnisse zeigen, dass die Behandlung von Mais mit AM geeignet ist, unter verringerter P- Verfügbarkeit die Produktivität aufrecht zu erhalten oder zu steigern, und dass das Potential besteht, Mais genetisch auf die optimale Nutzung der Symbiose mit AM zu optimieren. Das Szenario zukünftig weltweit abnehmender Phosphatressourcen und aus ökonomisch-ökologischen Gründen möglicherweise reduzierter Phosphor-Düngung in der Landwirtschaft findet in den Testbedingungen mit geringer Phosphatversorgung seine Entsprechung. Die Möglichkeit unter Trockenstress und unter niedrig-P Bedingungen Maispflanzen auf Ihre Wachstumssteigerung durch AM in diesem Zukunftsszenario testen zu können, ermöglicht eine gezielte Anpassung und Verbesserung bestehenden Zuchtmaterials.

Neben niedrig-P Bedingungen ist die automatisierte Phänotypisierungsanlage durch präzise Bewässerung auch in der Lage, gezielt Trockenstress zu simulieren. Die Simulation

verschiedener Stress-Faktoren und deren Kombinationen, sowie die Messung, welchen Einfluss AM in der verbesserten Stressresistenz von Mais gegen diese multiplen Stressfaktoren hat, ist damit möglich. Dies stellt eine wichtige Fortsetzung der hier durchgeführten Versuche dar und einen wichtigen weiteren Schritt in der Antwort auf die Frage wie sich AM – und auf AM abgestimmte Maiszüchtung - optimal in der Landwirtschaft in der Milderung von Klimawandel- Auswirkungen einsetzen lassen.

9 Veröffentlichungen im Rahmen des Projekts

2018:

Muth, P, E Bauer, C C Schön, C Gutjahr (2018): Influence of arbuscular mycorrhiza on stress resilience in a European maize diversity panel. 60th Annual Maize Genetics Conference, Saint-Malo, Frankreich, 22.-25.03.2018, Posterpräsentation

Gutjahr C (2018): Arbuscular mycorrhiza development and function. Seminarvortrag, Helmholtz Zentrum München-Neuherberg, Germany, 06.03.2018, Vortrag

Gutjahr C (2018): Arbuscular mycorrhiza development and function. Symposium of the International Max Planck Research School, Max Planck Institut für Molekulare Pflanzenphysiologie, Golm, 18.04.2018, Vortrag

Gutjahr C (2018): Arbuscular mycorrhiza development and function. Seminarvortrag, University of Sheffield, GB, 23.04.2018, Vortrag

Gutjahr C (2018): Arbuscular mycorrhiza and root development. Seminarvortrag, The Sainsbury Laboratory Cambridge, GB, 24.04.2018, Vortrag

Gutjahr C (2018): Arbuscular mycorrhiza: How food determines development. Seminarvortrag, Spanish National Biotechnology Center, Madrid, Spanien 25.05.2018, Vortrag

Gutjahr C (2018): Arbuscular mycorrhiza development and function. Seminarvortrag, Universität Düsseldorf CEPLAS, Düsseldorf, 11.06.2018, Vortrag

Gutjahr C (2018): Symposium Frontiers in Microbiology. Symposium Vortrag, Max Planck Institut für Terrestrische Mikrobiologie, Marburg, 22.11.2018, Vortrag

2017:

Gutjahr C (2017): Arbuscular mycorrhiza: how food determines development. 9th European Plant Science Retreat, Toulouse, Frankreich, 22.06.2017, Vortrag

Gutjahr C (2017): Lipid transfer from plants to arbuscular mycorrhiza fungi. iMMM 2017, 3rd international Molecular Mycorrhiza Meeting, Toulouse, Frankreich, 28.07.2017, Vortrag

Gutjahr C (2017): Lipid transfer from plants to arbuscular mycorrhiza fungi. ICOM 9, 9th International Conference on Mycorrhiza, Prag, Tschechien, 31.07.2017, Vortrag

Gutjahr C (2017): Phytohormone Signalling in Arbuscular Mycorrhiza Development. 44th Annual PGRSA Conference, Anchorage, USA, 06.-10.08.2017, Vortrag (keynote speaker)

Gutjahr C (2017): Butter for my honey: plants feed their symbiotic fungi with lipids. Excellent Women in Science Symposium, Köln, 05.10.2017, Vortrag

Geplante Publikationen:

Muth, P, E Bauer, C C Schön, C Gutjahr, et al. (2019): Influence of arbuscular mycorrhiza on stress resilience in a European maize diversity panel under field conditions. Geplanter wissenschaftlicher Fachartikel

Muth, P, W Vahl, M Herz, C Gutjahr, et al. (2019): Automated phenotyping of arbuscular mycorrhiza mediated growth responses in a European maize diversity panel. Geplanter wissenschaftlicher Fachartikel

Muth, P, E Bauer, W Vahl, M Herz, C C Schön, C Gutjahr (2019): Influence of arbuscular mycorrhiza on stress resilience in a European maize diversity panel. GPZ Konferenz Genome Research, Stuttgart- Hohenheim, 28.-29.03.2019, Geplante Posterpräsentation

10 Vernetzung zu weiteren Verbundpartnern und anderen Partnern

Es besteht eine fruchtbare Kooperation mit dem Institut für Pflanzenzüchtung der TU München, Lehrstuhl Prof. Dr. Chris Carolin Schön, über die der Zugang zu Feldversuchsflächen und genetische Ressourcen sichergestellt ist.

Über die Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Markus Herz vom Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft (LfL) konnte ein Gewächshaus-Versuch unter kontrollierten Bedingungen in der automatisierten LemnaTec Phänotypierungsanlage der LfL durchgeführt und die AM-Antwort von 16 Mais-Linien präzise erfasst werden.

Des Weiteren besteht eine Kooperation außerhalb des BayKimaFit Projektverbundes mit dem Lehrstuhl von Prof. Dr. Schnyder, Institut für Grünlandlehre der TU München, zur Analyse von ^{13}C Isotopen in Kornproben.

Als wichtige Kooperationspartner konnten neben der Pflanzenernährung der TU München, Lehrstuhl Prof. Dr. Schmidhalter, mit Herrn Prof. Stan Kopriva auch ein Experte der Pflanzenernährung an der Universität Köln gewonnen werden. Prof. Kopriva hat die Möglichkeit, dass sogenannte „Ionom“ - die Menge aller Nährelemente - in Blättern und Maiskörnern für uns zu bestimmen. Das wird uns nicht nur einen Einblick in den Nutzen der arbuskulären Mykorrhiza für die Pflanze (Blätter), sondern auch für den Nährwert der Maiskörner, geben.

Dr. Ruairidh Sawers vom Nationalen Genomlabor für Biodiversität in Mexiko (LANGEBIO) stellte Saatgut der *CASTOR*- Mutante zur Verfügung und gab wertvolle Hinweise in der Optimierung des Topfversuchs- Systems zur Messung von AM-Responsivität.

11 Zusammenfassung

Die Landwirtschaft der Zukunft steht vor großen Herausforderungen, weil die schon jetzt spürbare und in Zukunft möglicherweise zunehmende Klimaveränderung zu einer Häufung von ungünstigen Wetterereignissen führen wird, welche Wachstum und Ertrag von Kulturpflanzen beeinträchtigen. Gleichzeitig ist eine Einsparung von Kunstdünger geboten, da das darin enthaltene Phosphat weltweit zur Neige gehen wird, und die Auswaschung von Phosphaten aus Ackerböden die Umwelt belastet. Eine nachhaltige, zukunftssträchtige Landwirtschaft erfordert die Züchtung von Kulturpflanzensorten, welche sowohl stressresistent als auch Nährstoff-genügsam sind. Die arbuskuläre Mykorrhiza (AM) ist eine weitverbreitete Symbiose zwischen Landpflanzen und speziellen Bodenpilzen. Diese Symbiose verbessert die Nährstoffaufnahme und Stressresistenz – insbesondere gegen Trockenstress – von Pflanzen. Untersuchungen zeigen, dass das Ausmaß der AM-abhängigen Leistungssteigerung der Pflanze, die sogenannte „AM-Responsivität“ von der Pflanzensorte abhängt [14]. Die genetische Grundlage der AM-Responsivität ist derzeit unbekannt und muss weiter aufgeklärt werden.

In diesem Projekt sollte die genetische Vielfalt von Mais genutzt werden, um zur Selektion und Züchtung AM-optimierter Kulturpflanzensorten beizutragen. Hierfür wurde die AM-vermittelte Trockenstressresistenz, Wachstums- und Produktivitätssteigerung von 18 europäischen Mais-Inzuchtlinien und zusätzlichen Kontrollsorten (Tabelle 1, Anhang) anhand von Wachstums- und Ertragsparametern in zweijährigen Feldversuchen in einem praxisüblichen, vollversorgten Feld und einem Trockenstress- Versuch im Rollhaus verglichen. Hier zeigten sich Unterschiede in der AM-Responsivität zwischen den untersuchten Linien für die verschiedenen Testumwelten, wobei unter Trockenstress-Bedingungen zwei Linien von der Behandlung mit Sporen des AM Pilzes *Rhizophagus irregularis* deutlich profitierten. Dies waren die Linien F353 und PH207.

Zusätzlich wurden im zweiten und dritten Projektjahr parallel zu den Vergleichsversuchen Feldversuche in einem Feld mit geringer Phosphatversorgung durchgeführt, um die Wachstumssteigerung und möglicherweise verbesserte Phosphatversorgung durch AM- Behandlung unter diesen Stressbedingungen zu erforschen. Speziell unter niedriger Phosphatverfügbarkeit im Boden zeigte eine Behandlung mit Sporen von *Rhizophagus irregularis* zur Aussaat im Versuchsmittelwert eine Ertragssteigerung über beide Versuchsjahre hinweg. Gemäß diesem Trend im Mittelwert zeigten hier mehrere Linien über zwei Jahre stabile Ertragssteigerungen bei Biomasse und Kornertrag nach AM- Behandlung; UH304, Oh7b, Mo17, F618, und W22.

Nach Vorarbeiten in den ersten beiden Projektjahren konnte im dritten Jahr ein umfangreicher Topfversuch angelegt werden in dem die Genotypen der Trockenstress- und niedrig-P Feldversuche unter kontrollierten Bedingungen, d. h. unter Ausschluss der frei lebenden AM-Spezies, gezielt ohne AM und nach gezielter Inokulation mit *Rhizophagus irregularis* auf die AM-vermittelte Leistungssteigerung getestet wurden.

Die in den niedrig-P Feldversuchen als AM-responsiv identifizierten Mais Linien - mit Ausnahme von UH304 - finden sich auch im Topfversuch mit niedriger P-Versorgung unter den am stärksten AM-responsiven Genotypen in Bezug auf Sprossoberfläche und Biomasseertrag. Die Ergebnisse aus den zwei niedrig-P Versuchen unterstützen sich somit gegenseitig, und lassen hoffen, dass sich Ergebnisse aus Topfversuchen auch ins Feld übertragen lassen, und ebenso umgekehrt.

Für andere AM-responsive Maislinien des Topfversuches ergab sich im Vergleich zu den Ergebnissen im niedrig-P Feldversuch eine gewisse Genotyp-Umwelt Interaktion, da D06 und D09 im Topfversuch und im niedrig-P Versuch 2017 eine AM-Antwort zeigten, die aber im Feldversuch 2018 nicht bestätigt werden konnte. Im Gegenzug erwies sich UH304, eine der im niedrig-P Feldversuch am stärksten AM-responsiven Genotypen, unter den Bedingungen des Topfversuchs im Vergleich zu anderen Genotypen weniger responsiv.

Eine mögliche Erklärung für die beobachteten Genotyp-Umwelt Interaktionen in der AM-Responsivität einzelner Linien könnte in einer unterschiedlichen funktionalen Kompatibilität zwischen den getesteten Mais-Genotypen, der inokulierten AM Pilz-Spezies, und den verschiedenen Spezies der AM Pilz-Populationen der Feldversuchsflächen begründet liegen. Diese Möglichkeit gilt es durch genauere molekulare Untersuchungen der in diesem Projekt genommenen Wurzelproben weiter zu untersuchen.

Alle unsere Ergebnisse zeigen insgesamt, dass Mais sehr gut durch AM Pilze besiedelt wird und sehr gut auf die Symbiose reagiert. Sie unterstreichen die Wichtigkeit der optimalen Integration von AM im Maisanbau unter dem Szenario zukünftig weltweit abnehmender Phosphatressourcen und somit möglicherweise reduzierter Phosphor-Düngung in der Landwirtschaft.

Wir erwarten, diese Unterschiede in der AM-Responsivität in Zukunft nutzen zu können, um Genomregionen herauszufiltern, welche für die quantitativen Unterschiede der AM-Responsivität unter verschiedenen Stress-Szenarien verantwortlich sind. Die Kenntnis dieser Genomregionen kann dann zur gezielten Marker-gestützten Pflanzenzüchtung AM-optimierter Sorten genutzt werden.

12 Ausblick

Weiter andauernde Arbeiten sind die Quantifizierung der Kolonisierung der Wurzelproben aus Feld- und Topfversuchen auf mikroskopischer und molekularbiologischer Ebene, die Analyse der Blatt- Nährstoffgehalte (insbesondere Phosphat) und der Zusammensetzung der Kohlenstoffisotope der Körnerproben aus dem Jahr 2018, sowie die gesammelte statistische Auswertung der Daten vereint über Jahre und Versuche hinweg.

Der erfolgreich durchgeführte Topfversuch ermöglichte eine besonders sichere Identifizierung von in der AM-Antwort kontrastierenden Genotypen und entwickelte eine geeignete Methodik zur Durchführung einer Studie differentieller Transkription. Dieses RNA-Sequenzierungs-Experiment wird derzeit vorbereitet.

Die Etablierung einer verlässlichen Methodik zur Phänotypisierung der AM-Antwort unter kontrollierten Bedingungen legte die Grundlage zur erfolgreichen zukünftigen Phänotypisierung einer umfangreichen Kartierungspopulation. Auf Basis unserer erfolgreichen Ergebnisse in der automatisierten Phänotypisierungsanlage wird derzeit das Saatgut von drei kontrastierende EU-NAM Kartierungspopulationen als Grundlage weiterführender Projekte zur Identifizierung der der AM-Antwort zugrundeliegenden genomischen Polymorphismen vermehrt.

13 Literaturverzeichnis

- [1] Smith, S. & Read, D. Mycorrhizal Symbiosis. 3rd edn., Academic Press London, (2008).
- [2] Smith, S. E. & Smith, F. A. Roles of arbuscular mycorrhizas in plant nutrition and growth: new paradigms from cellular to ecosystem scales. *Annual Review of Plant Biology* 62, 227-250, (2011).
- [3] Govindarajulu, M. et al. Nitrogen transfer in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Nature* 435, 819-823 (2005).
- [4] Bona, E. et al. AM fungi and PGP pseudomonads increase flowering, fruit production, and vitamin content in strawberry grown at low nitrogen and phosphorus levels. *Mycorrhiza*, 1-13, (2014).
- [5] Flores-Ramirez, R. et al. Coordinated changes in the accumulation of metal ions in maize (*Zea mays* ssp. *mays* L.) in response to inoculation with the arbuscular mycorrhizal fungus *Funneliformis mosseae*. *Plant and Cell Physiology* 58 (10), 1689–1699 (2017)
- [6] Porcel, R. & Ruiz-Lozano, J. M. Arbuscular mycorrhizal influence on leaf water potential, solute accumulation, and oxidative stress in soybean plants subjected to drought stress. *Journal of Experimental Botany* 403, 1743-1750 (2004).
- [7] Estrada, B. et al. Arbuscular mycorrhizal fungi native from a Mediterranean saline area enhance maize tolerance to salinity through improved ion homeostasis. *Plant, Cell & Environment* 36, 1771-1782, (2013).
- [8] Khalvati, M. et al. Quantification of water uptake by arbuscular mycorrhizal hyphae and its significance for leaf growth, water relations, and gas exchange of barley subjected to drought stress. *Plant Biology* 7, 706-712, (2005).
- [9] Bárzana, G. et al. Arbuscular mycorrhizal symbiosis increases relative apoplastic water flow in roots of the host plant under both well-watered and drought stress conditions. *Annals of Botany* 109, (2012).
- [10] Gianinazzi, S. et al. Agroecology: the key role of arbuscular mycorrhizas in ecosystem services. *Mycorrhiza* 20, 519-530, (2010).
- [11] Sawers, R. J. H., Gutjahr, C. & Paszkowski, U. Cereal mycorrhiza: an ancient symbiosis in modern agriculture. *Trends in Plant Science* 13, 93-97 (2008).
- [12] Kaeppler, S. M. et al. Variation among maize inbred lines and detection of quantitative trait loci for growth at low phosphorous and responsiveness to arbuscular mycorrhizal fungi. *Crop Sci.* 40, 358-364 (2000).
- [13] Ercoli, L. et al. Strong increase of durum wheat iron and zinc content by field-inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi at different soil nitrogen availabilities. *Plant, Soil and Environment* (2017).
- [14] Schlaeppi, K. et al. High-resolution community profiling of arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* (2016).
- [15] Lanfanco, L. et al. Partner communication and role of nutrients in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *New Phytologist* (2018).
- [16] Bauer, E. et al. Intraspecific variation of recombination rate in maize. *Genome Biology* 14, R103 (2013).
- [17] Gresset, S. et al. Stable carbon isotope discrimination is under genetic control in the C4 species maize with several genomic regions influencing trait expression. *Plant Physiology* 164, 131-143, (2014).
- [18] Imaizumi-Anraku, H. et al. Plastid proteins crucial for symbiotic fungal and bacterial entry into plant roots. *Nature* 433, 527-531 (2005).

- [19] Sawers, R. et al. Characterizing variation in mycorrhiza effect among diverse plant varieties. *Theoretical and Applied Genetics* (2009).
- [20] Sawers, R. et al. Phosphorus acquisition efficiency in arbuscular mycorrhizal maize is correlated with the abundance of root-external hyphae and the accumulation of transcripts encoding PHT1 phosphate transporters. *New Phytologist* (2017).

14 Abkürzungsverzeichnis

AM	Arbuskuläre Mykorrhiza
¹³ C	Kohlenstoff-Isotop 13
Dent	Dent-Genpool von Mais
G	Gewächshaus
F	Feld
Flint	Flint-Genpool von Mais
EU NAM	Europäische Kollektion von verbundenen Assoziations-Kartierung Populationen (EU Nested Association Mapping population)
LANGEBIO	Nationales Genomlabor für Biodiversität, Mexiko (Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad)
LemnaTec	Hersteller automatischer Phänotypisierungsanlagen
LfL	Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität München
NAM	Nested Association Mapping (s. EU NAM)
P	Phosphor
SPAD	Messwert für Blatt-Chlorophyll (Soil-Plant Analyses Development)
T	Trockenstress
TU München	Technische Universität München

15 Anhang



Abb. 2: Trockenstress-Versuche unter kontrollierten, praxisnahen Bedingungen im Rollhaus 2016, nach Aussaat (links) und kurz vor der Ernte (rechts).

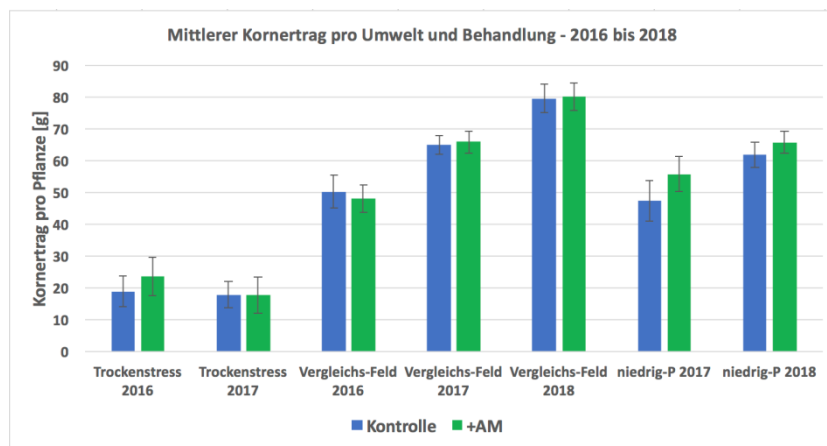


Abb. 3: Der mittlere Kornertrag der Feldversuche 2016, 2017 und 2018 zeigt unterschiedliche Jahres-, Umwelt-, und Behandlungseffekte in den Trockenstress-, Vergleichs-, und niedrig-P Versuchen.

Die Balken repräsentieren Versuchsmittelwerte und Standardfehler über alle Genotypen hinweg, ohne- (Kontrolle) und mit zusätzlicher AM Behandlung (+AM).

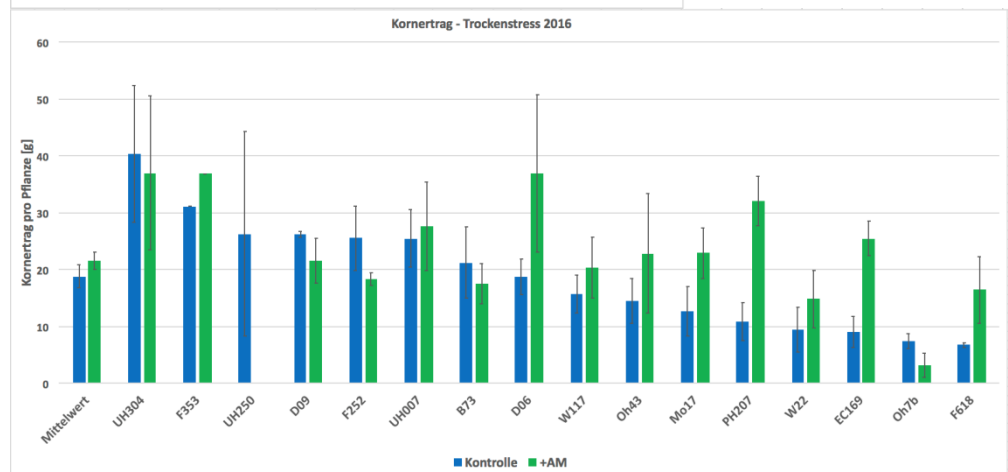
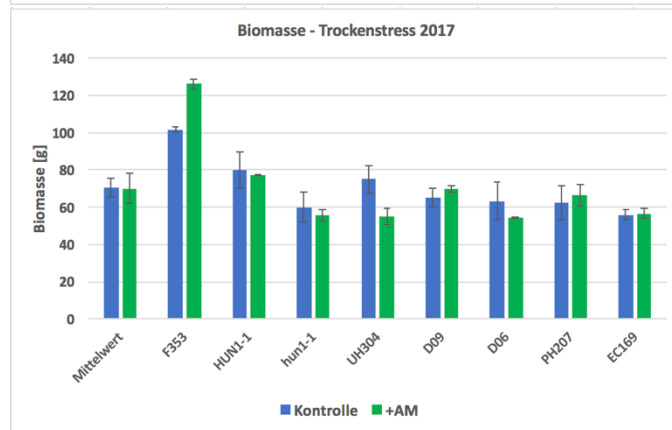
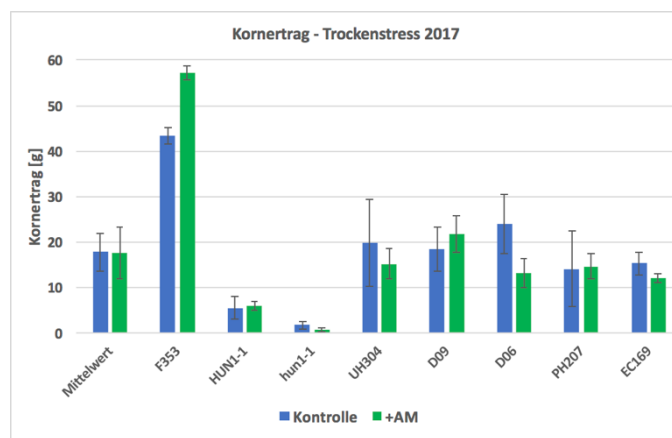


Abb. 4: Kornertrag und Biomasse (2017) der Mais- Genotypen in den Trockenstress-Versuchen 2016 und 2017 zeigen Sorten-typische Unterschiede in der AM-Responsivität.

Die Balken repräsentieren Versuchsmittelwerte und Standardfehler aus drei Wiederholungen pro Genotyp, ohne (Kontrolle) und mit zusätzlicher AM Behandlung (+AM), in der Reihenfolge des höchsten Korn- (2016) bzw. Bio-masse-Ertrags (2017) der Kontrollpflanzen.

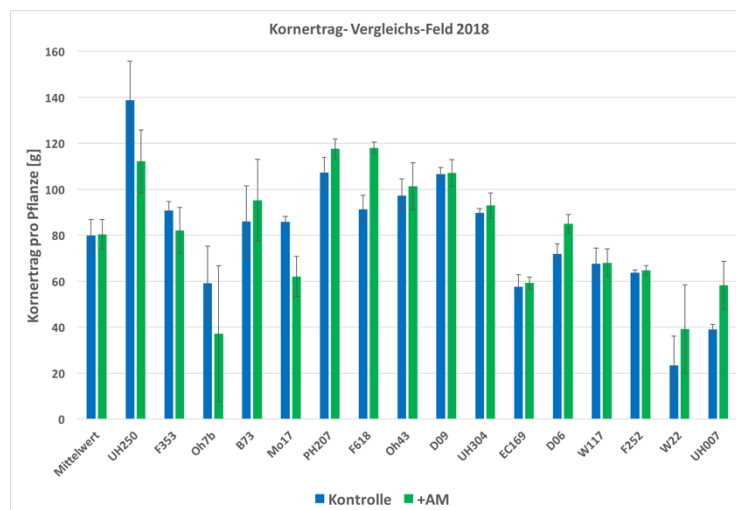
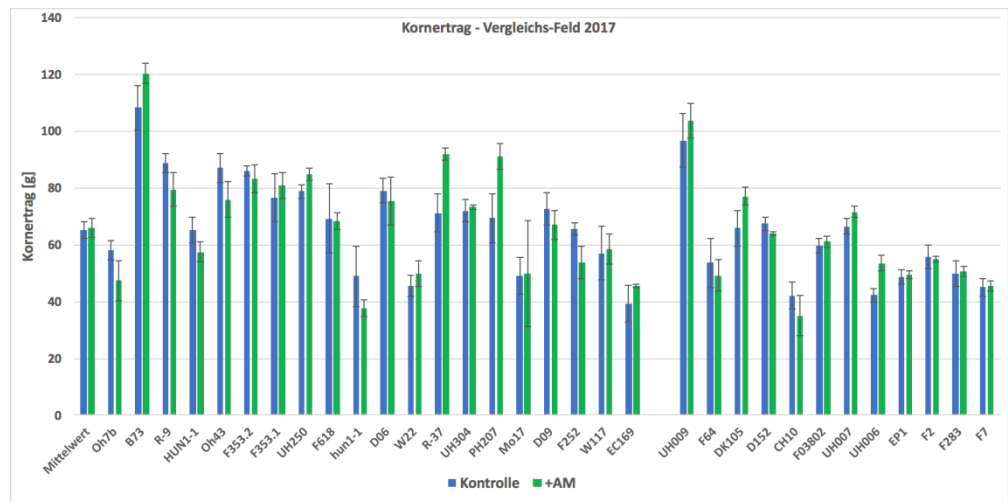
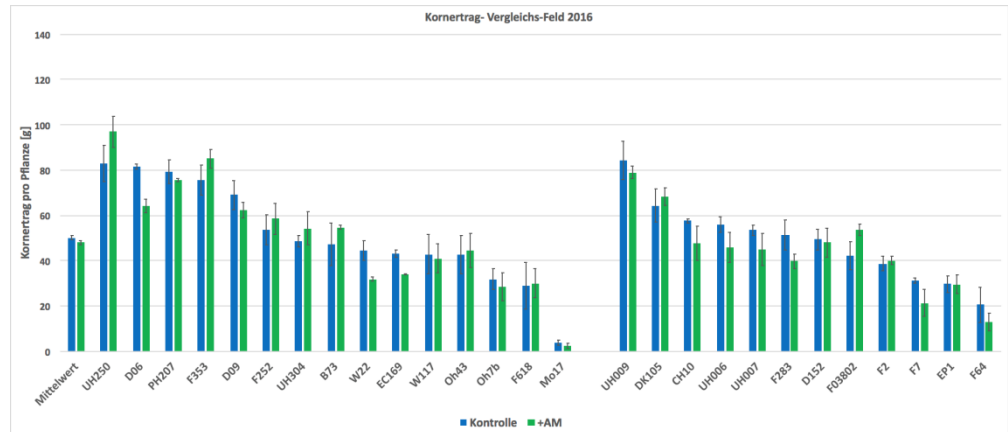


Abb. 5: Der Kornertrag der Mais-Genotypen im Vergleichs-Feld 2016, 2017, und 2018 zeigt Sorten-spezifische Unterschiede in der AM-Responsivität über die Versuchsjahre.

Die Balken repräsentieren Versuchsmittelwerte und Standardfehler aus drei Wiederholungen pro Genotyp, ohne (Kontrolle) und mit zusätzlicher AM Behandlung (+AM). Geordnet in der Reihenfolge des höchsten Korn- (2016) bzw. Biomasse-Ertrags (2017 - 2018) der Kontrollpflanzen. 2016 - 2017: Dent-Genotypen links, Flint rechts.

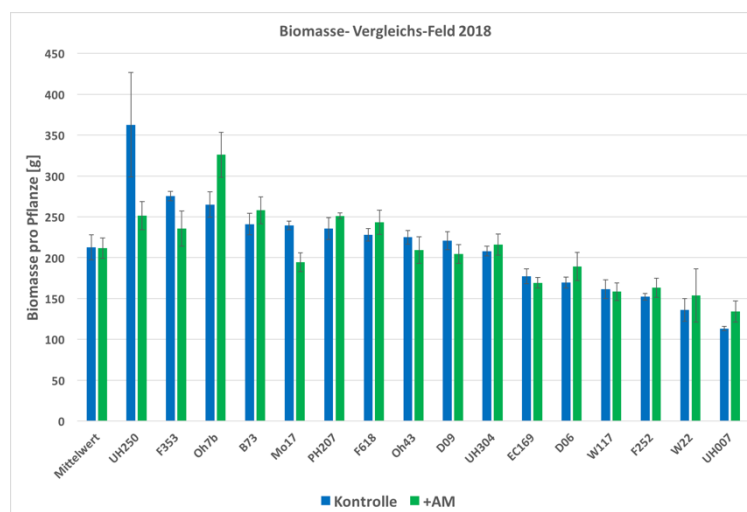
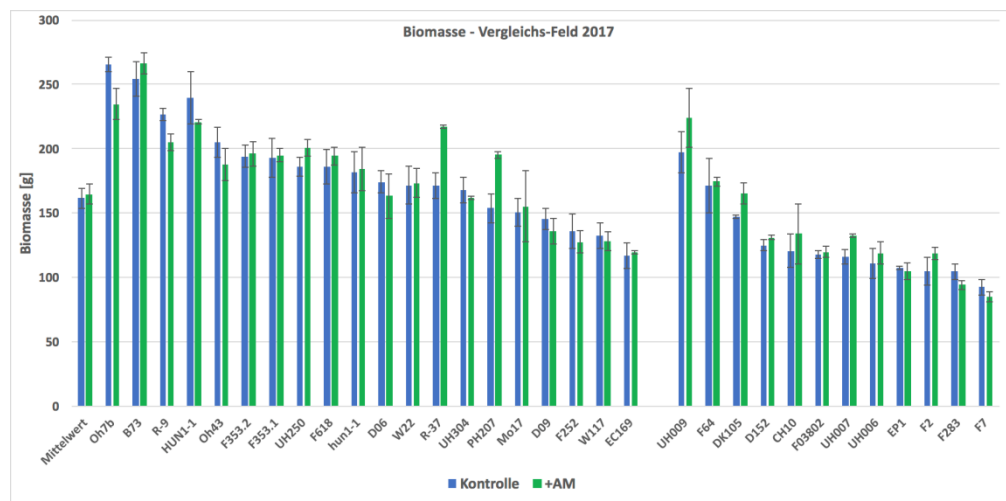


Abb. 6: Der Biomasseertrag der Mais-Genotypen im Vergleichs-Feld 2017 und 2018 zeigt Sorten-spezifische Unterschiede in der AM-Responsivität über die Versuchsjahre.

Die Balken repräsentieren Versuchsmittelwerte und Standardfehler aus drei Wiederholungen pro Genotyp, ohne (Kontrolle) und mit zusätzlicher AM Behandlung (+AM). Geordnet in der Reihenfolge des höchsten Biomasse-Ertrags der Kontrollpflanzen. 2017: Dent-Genotypen links, Flint rechts.

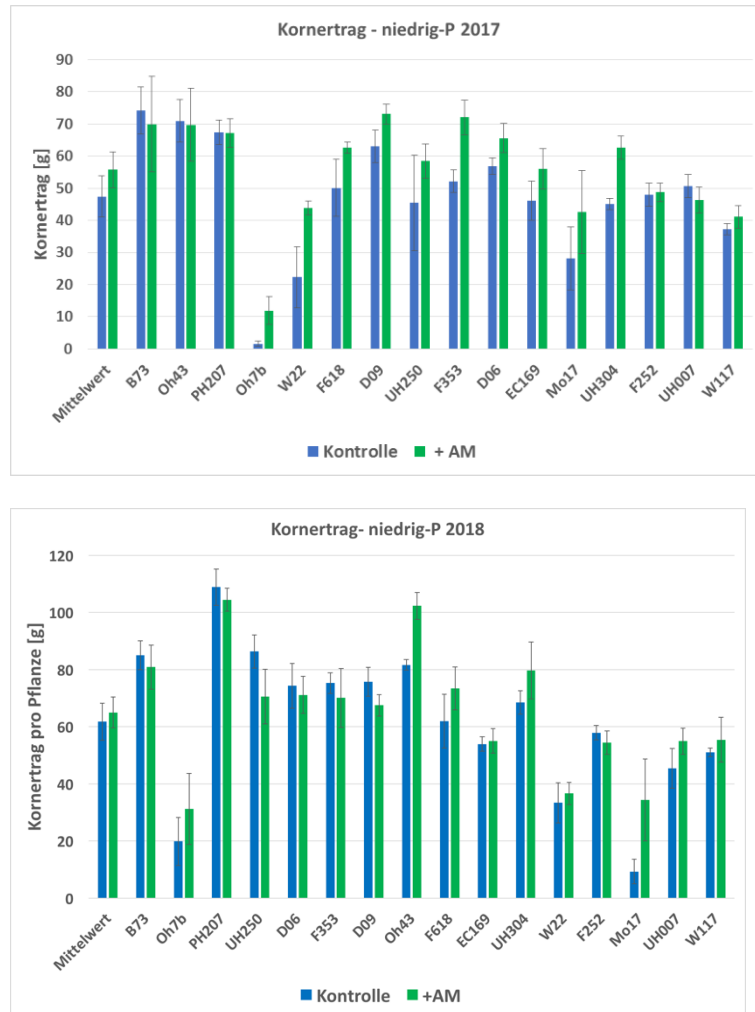


Abb. 7: Der Kornertrag der Mais- Genotypen im niedrig-P Feld 2017 und 2018 zeigt die AM-Responsivität im Versuchsmittel, und sorten-spezifische Unterschiede in der AM-Responsivität über die Versuchsjahre.

Die Balken repräsentieren Versuchsmittelwerte und Standardfehler aus drei Wiederholungen pro Genotyp, ohne (Kontrolle) und mit zusätzlicher AM Behandlung (+AM), in der Reihenfolge des höchstens Biomasse-Ertrags der Kontrollpflanzen.

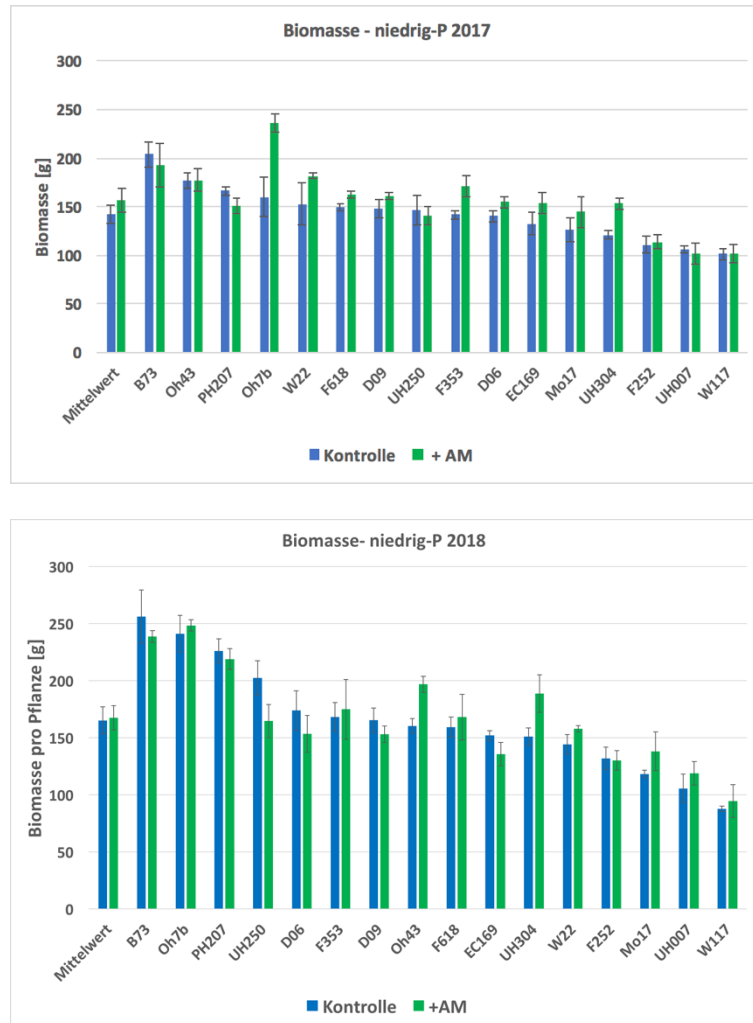


Abb. 8: Der Biomasseertrag der Mais-Genotypen im niedrig-P Feld 2017 und 2018 zeigt die AM-Responsivität im Versuchsmittel, und sorten-spezifische Unterschiede in der AM-Responsivität über die Versuchsjahre.

Die Balken repräsentieren Versuchsmittelwerte und Standardfehler aus drei Wiederholungen pro Genotyp, ohne (Kontrolle) und mit zusätzlicher AM Behandlung (+AM), in der Reihenfolge des höchstens Biomasse-Ertrags der Kontrollpflanzen.

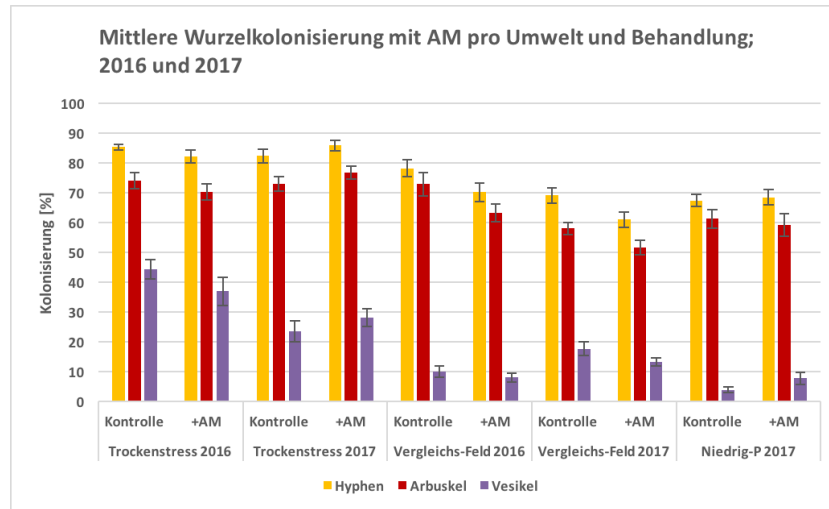


Abb. 9: Die durchschnittliche Kolonisierung von Maiswurzeln mit verschiedenen Strukturen von AM-Pilzen in den fünf Feldversuchen in den Jahren 2016 und 2017 zeigt unterschiedliche Kolonisierungsgrade pro Versuch und Jahr, während der Effekt der AM-Behandlung (+AM) darauf eher gering ausfällt.

Die Balken repräsentieren Versuchsmittelwerte und Standardfehler über alle Genotypen hinweg, ohne (Kontrolle) und mit zusätzlicher AM Behandlung (+AM).

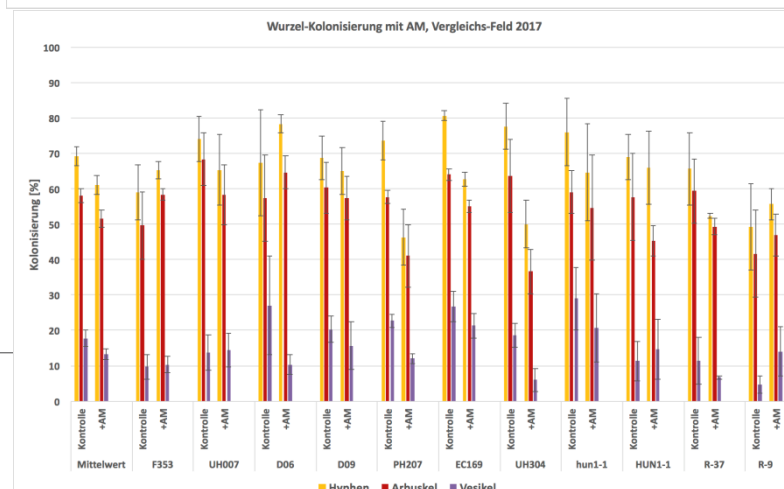
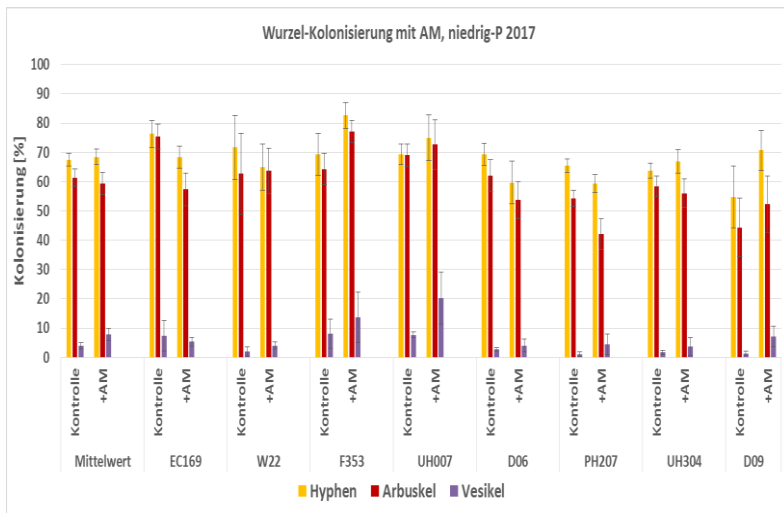
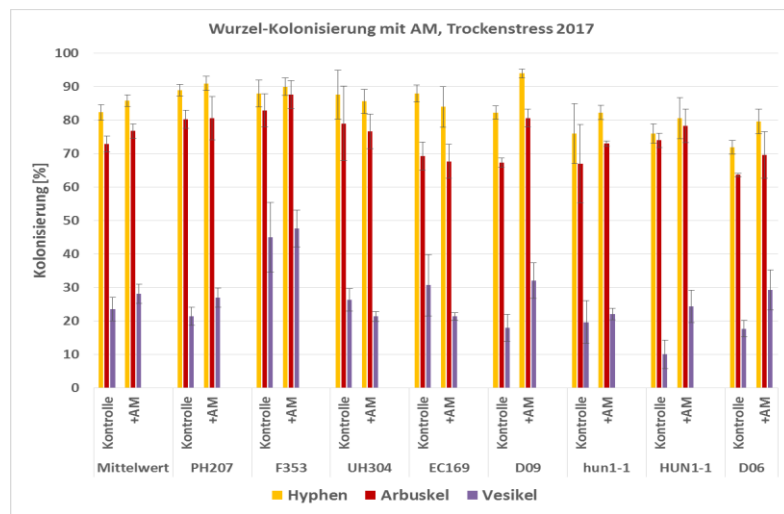


Abb. 10: Die Kolonisierung von Maiswurzeln mit Strukturen von AM-Pilzen in den verschiedenen Feldversuchen 2017 zeigt unterschiedliche Kolonisierungsgrade pro Genotyp, Feldversuch und AM-Behandlung: im Vergleichsfeld (oben), im Trockenstress-Versuch (Mitte) und im niedrig-P Versuch (unten). Die Balken repräsentieren Versuchsmittelwerte und Standardfehler aus drei Wiederholungen pro Genotyp, ohne (Kontrolle) und mit zusätzlicher AM Behandlung (+AM).



Abb. 11: Topfversuch zur differentiellen AM-Antwort von 16 Mais-Genotypen in der automatisierten LemnaTec Anlage der LfL. Gewächshaus und Bewässerungsanlage (links), automatisierte Bildaufnahme-Kammern (rechts).

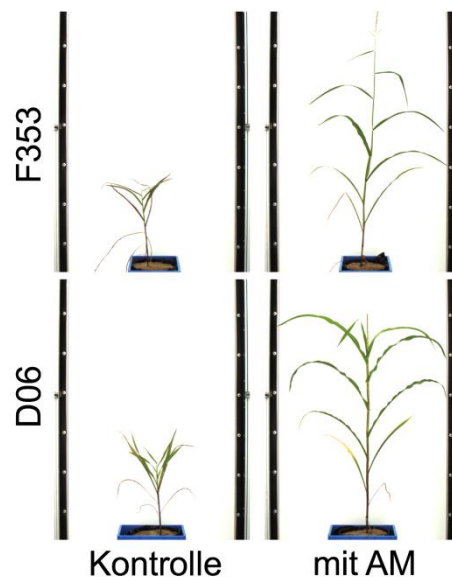


Abb. 12: Beispielhafte Foto-Aufnahmen von zwei in der AM-Antwort kontrastierenden Genotypen in der LemnaTec Phänotypisierungsanlage der LfL, 58 Tage nach Aussaat.

Linie F353 (oben) ist weniger AM-responsiv als Linie D06 (unten).

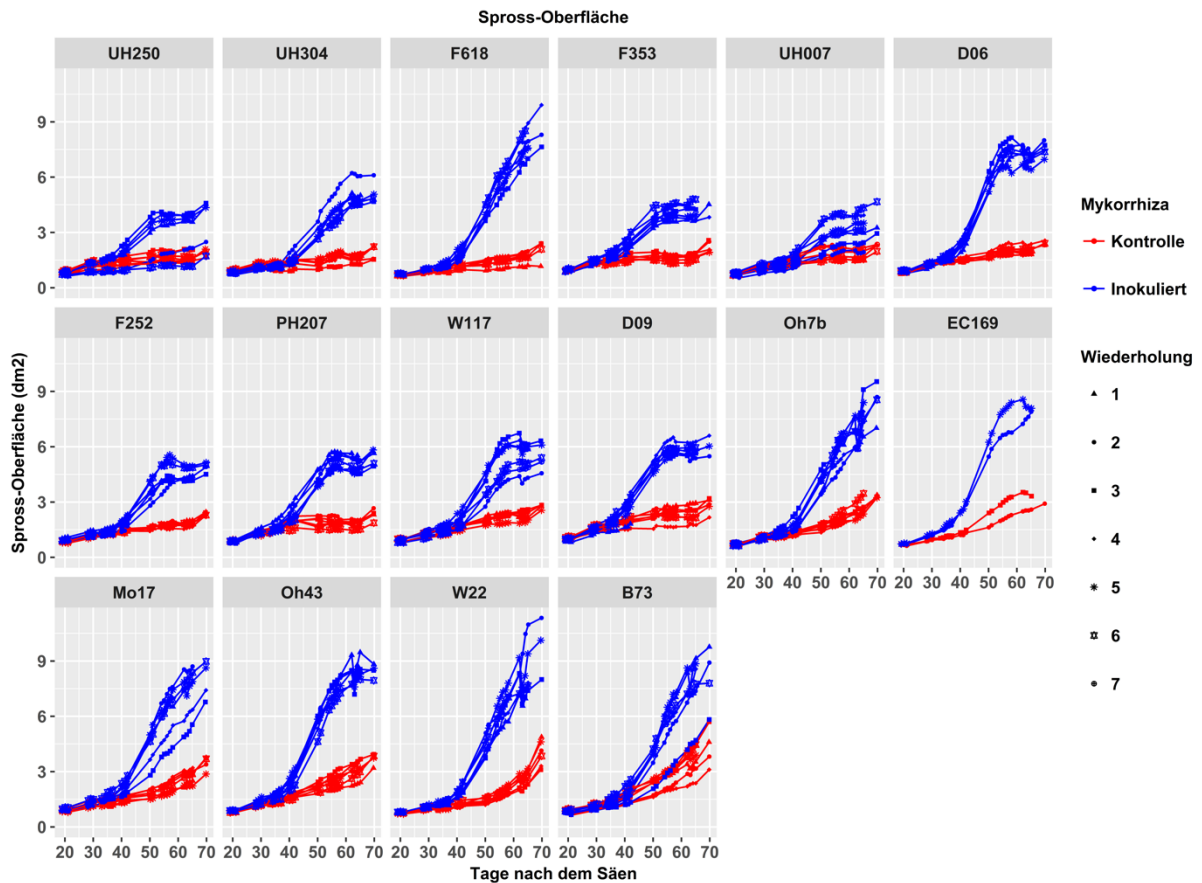


Abb. 13: Die zeitliche Entwicklung der Pflanzen-Oberflächen im Topfversuch zeigt Unterschiede sowohl in der Wachstums-Reaktion auf Behandlung mit AM-Pilzen (Inokuliert, blau) als auch der intrinsischen Nährstoff-Effizienz der verschiedenen Genotypen ohne AM (Kontrolle, rot).

Die Kurven zeigen die mittlere Oberfläche pro Pflanze, ermittelt aus vier horizontalen Kamerablickwinkeln. Die Genotypen sind in der Reihenfolge der mittleren Oberfläche der Kontroll-Pflanzen angeordnet.

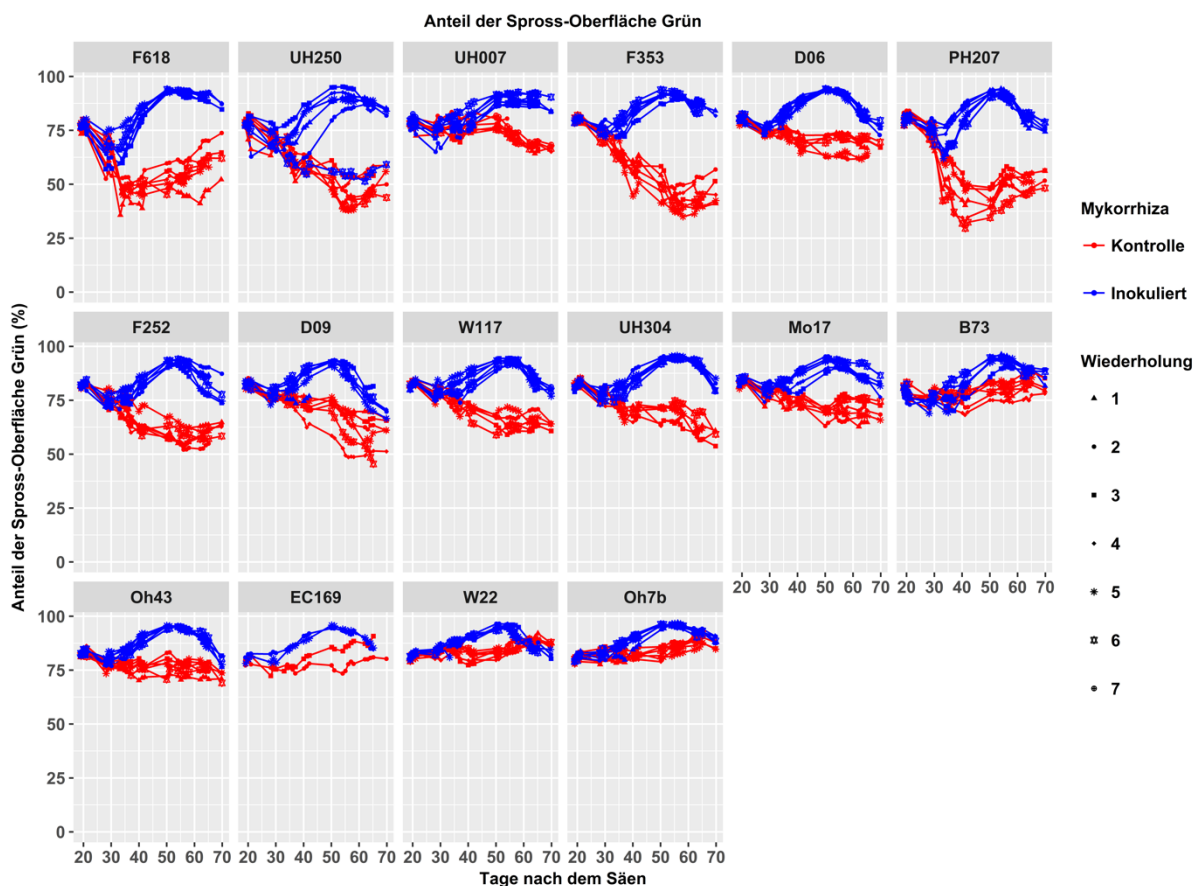


Abb. 14: Die zeitliche Entwicklung des Grün- Anteils an den Pflanzenoberflächen im Topfversuch zeigt Unterschiede im pflanzlichen Ernährungsstatus sowohl in der Reaktion auf Behandlung mit AM-Pilzen (Inokuliert, blau) als auch in der intrinsischen Nährstoff- Effizienz der verschiedenen Genotypen ohne AM (Kontrolle, rot).

Die Kurven zeigen den prozentualen Grün-Anteil der mittleren Oberfläche pro Pflanze, ermittelt aus vier horizontalen Kamerablickwinkeln. Die Genotypen sind in der Reihenfolge der mittleren grünen Oberfläche der Kontroll-Pflanzen angeordnet.

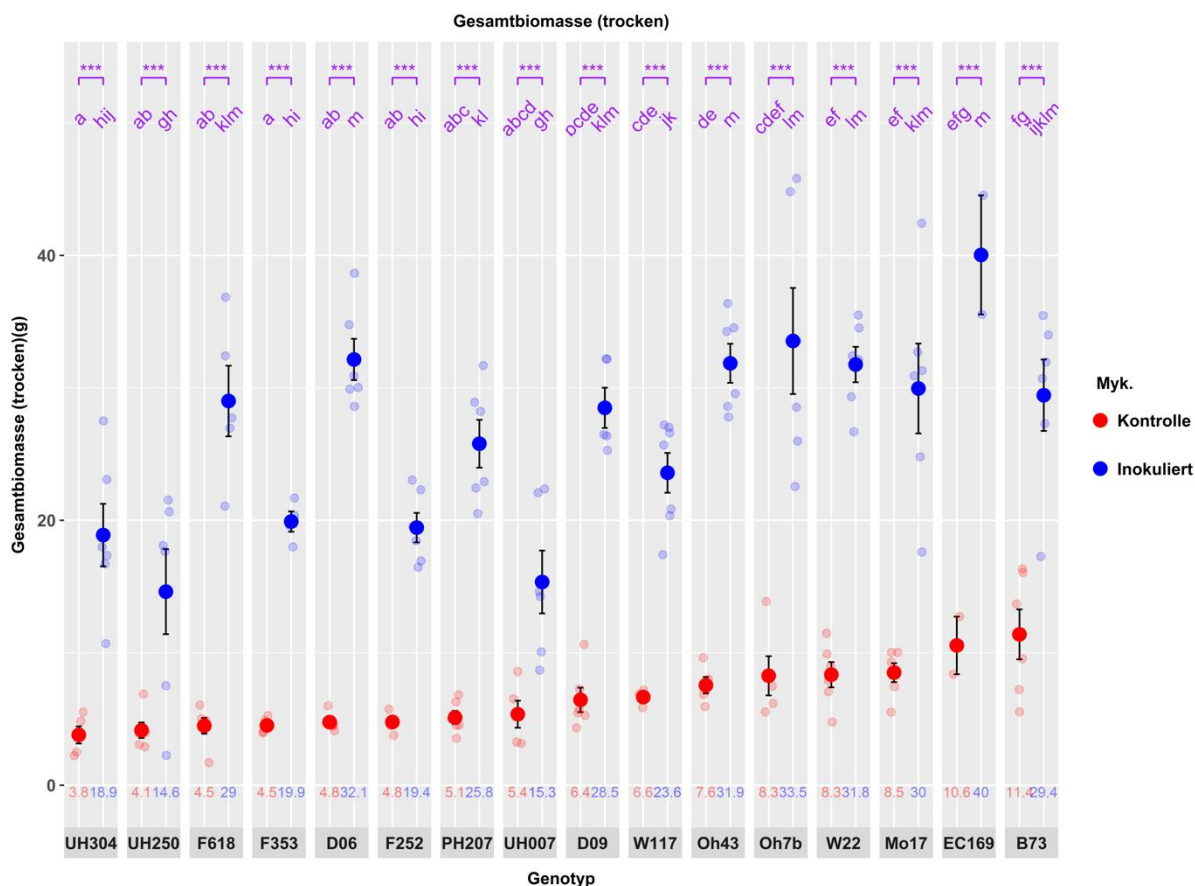


Abb. 15: Die Menge der geernteten Gesamt- Biomasse im Topfversuch zeigt Unterschiede sowohl in der deutlichen Wachstums- Reaktion auf Behandlung mit AM Pilzen (Inokuliert, blau) als auch der intrinsischen Nährstoff-Effizienz der verschiedenen Genotypen ohne AM (Kontrolle, rot).

Die schwach eingefärbten Datenpunkte stellen den Gesamtbiomasse-Ertrag von Wurzel und Spross pro Genotyp und Behandlung dar, während stark gefärbte Punkte Mittelwert und Standardabweichung zeigen. Drei lilafarbene Sterne zeigen signifikante Unterschiede in der Antwort auf AM pro Genotyp, $p=0,001$ (ANOVA), verschiedene lilafarbenen Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede zwischen allen Behandlungen an. Die Genotypen sind in der Reihenfolge des mittleren Biomasse-Ertrags (farbige Datenunterschriften) der Kontroll-Pflanzen angeordnet.

Tabelle 1: Elternlinien der EU-NAM Population und Vergleichssorten in den Feld-, Trockenstress- und niedrig-P Versuchen 2016 bis 2018 (nach [16])

Genpool	Genotyp	Eigenschaft	2016	2017	2018
Dent	F353	EU NAM Kreuzungselter	F + T	F + T + P	F + P + G
	B73	US NAM Kreuzungselter	F + T	F + P	F + P + G
	D06	EU NAM Elternlinie	F + T	F + T + P	F + P + G
	D09	EU NAM Elternlinie	F + T	F + T + P	F + P + G
	EC169	EU NAM Elternlinie	F + T	F + T + P	F + P + G
	F252	EU NAM Elternlinie	F + T	F + P	F + P + G
	F618	EU NAM Elternlinie	F + T	F + P	F + P + G
	Mo17	US NAM Kreuzungselter	F + T	F + P	F + P + G
	UH250	EU NAM Elternlinie	F + T	F + P	F + P + G
	UH304	EU NAM Elternlinie	F + T	F + T + P	F + P + G
	W117	EU NAM Elternlinie	F + T	F + P	F + P + G
	Flint	UH007	EU NAM Kreuzungselter	F + T	F + P
D152		EU NAM Elternlinie	F	F	-
F03802		EU NAM Elternlinie	F	F	-
F2		EU NAM Elternlinie	F	F	-
F283		EU NAM Elternlinie	F	F	-
F64		EU NAM Elternlinie	F	F	-
UH006		EU NAM Elternlinie	F	F	-
UH009		EU NAM Elternlinie	F	F	-
DK105		EU NAM Elternlinie	F	F	-
Gemischt/ Vergleichs- sorten		Oh43	US NAM, AM responsiv	F + T	F + P
	Oh7b	US NAM, AM non-responsiv	F + T	F + P	F + P + G
	CH10	Vergleichssorte	F	F	-
	EP1	Vergleichssorte	F	F	-
	F7	Vergleichssorte	F	F	-
	PH207	Vergleichssorte	F + T	F + T + P	F + P + G
	W22	Vergleichssorte	F + T	F + P	F + P + G
	HUN1-1	W22- <i>HUN1-1</i> Wildtyp	-	F + T	-
	hun1-1	W22- <i>hun1-1</i> Mutante	-	F + T	-
	R-9	Benzoxaxionid-Linie	-	F	-
	R-37	Benzoxaxionid-Linie	-	F	-

F: offener Feldversuch, Vergleichsfeld; T: Trockenstress- Versuch; P: niedrig-P Versuch; G: Gewächshaus

Tabelle 2: Ursprung der EU-NAM Linien (nach [16])

Line	Genpool	Quelle
B73	Dent	Iowa State Universität, USA (bezogen vom USDA)
D06	Dent	Universität Hohenheim, Deutschland
D09	Dent	Universität Hohenheim, Deutschland
EC169	Dent	CIAM, Spanien
F252	Dent	INRA, Frankreich
F353 (Kreuzungselter)	Dent	INRA, Frankreich
F618	Dent	INRA, Frankreich
Mo17	Dent	Universität Missouri, USA (bezogen von USDA)
UH250	Dent	Universität Hohenheim, Deutschland
UH304	Dent	Universität Hohenheim, Deutschland
W117	Dent	Universität Wisconsin, USA (bezogen von USDA)
D152	Flint	Universität Hohenheim, Deutschland
DK105	Flint	Universität Hohenheim, Deutschland
F03802	Flint	INRA, Frankreich
F2	Flint	INRA, Frankreich
F64	Flint	INRA, Frankreich (stammt aus Argentinien)
F283	Flint	INRA, Frankreich
UH006	Flint	Universität Hohenheim, Deutschland
UH007 (Kreuzungselter)	Flint	Universität Hohenheim, Deutschland
UH009	Flint	Universität Hohenheim, Deutschland

Tabelle 3: Boden- Nährstoff Analysewerte und Versorgungsstufe für Feld- und Trockenstressversuch und niedrig-P Versuch. Analysewerte in mg/100g.

Probe	pH	Phosphat		Kalium		Magnesium	
		P₂O₅	Stufe	K₂O	Stufe	Mg	Stufe
Feld	7,2	22	D	16	C	11,3	C
Rollhaus	7,2	28	D	18	C	13	C
Niedrig-P	7,0	4	A	10,5	C	-	-