

Abschlussbericht Teilprojekt 10

Trockentoleranz durch bessere Wassernutzung

Projektverbund

BayKlimaFit 2 – Starke Pflanzen im Klimawandel

Finanziert durch

Bayerisches Staatsministerium für
Umwelt und Verbraucherschutz
Rosenkavalierplatz 2
81925 München

Projektnehmer

Technische Universität München
Lehrstuhl für Pflanzenzüchtung
Prof. Dr. Chris-Carolin Schön und Dr. Viktoriya Avramova
Liesel-Beckmann-Straße 2
85354 Freising
Tel.: 08161-713421
Fax: 08161-714511
E-Mail: chris.schoen@tum.de
Web: www.bayklimafit.de

Berichtszeitraum:

1. Juni 2021 bis 31. Oktober 2024



finanziert durch
Bayerisches Staatsministerium für
Umwelt und Verbraucherschutz



Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----------|
| Inhaltsverzeichnis | 2 |
| Abkürzungsverzeichnis | 3 |
| 1 Kurzzusammenfassung | 4 |
| 2 Einführung | 5 |
| 2.1 Die Rolle der Stomata bei der Reaktion von Pflanzen auf abiotischen Stress | 5 |
| 2.2 Die Rolle der Stomata bei der Reaktion von Pflanzen auf biotischen Stress | 6 |
| 2.3 Experimentelle Maislinien zur Bestimmung der Rolle der Stomataeigenschaften bei kombinierten Stressfaktoren | 6 |
| 3 Zielstellung | 8 |
| 4 Ergebnisse und Diskussion | 9 |
| 4.1 Klimakammerexperimente (AP1)..... | 9 |
| 4.1.1 Optimierung biotischer Stress (A1)..... | 9 |
| 4.1.2 Klimakammerexperiment biotischer Stress (A2)..... | 10 |
| 4.1.3 Klimakammerexperimente Trockenstress + Kälte (A3)..... | 12 |
| 4.1.4 Klimakammerexperimente Trockenstress + Hitze (A4)..... | 13 |
| 4.1.5 Klimakammerexperimente Trockenstress + erhöhtes CO ₂ (A5)..... | 17 |
| 4.1.6 Allelische Diversität des Gens ZmAbh4 (A6)..... | 18 |
| 4.2 Gewächshausexperimente (AP2)..... | 20 |
| 4.3 Feldexperimente (AP3) | 20 |
| 4.3.1 Feldexperimente Trockenstress (A10)..... | 20 |
| 4.3.2 Feldexperimente Trockenstress+ Hitze (A11)..... | 25 |
| 4.4 Stellungnahme zum Projekterfolg und aktualisierter Zeitplan | 25 |
| 4.5 Nutzen und Verwertbarkeit der Projektergebnisse sowie Einordnung in die Bayerische Klima-Anpassungsstrategie | 27 |
| 5 Veröffentlichungen | 28 |
| 6 Vernetzungen | 29 |
| 7 Geplante oder bestehende Industriebeteiligung | 29 |
| 8 Zusammenfassung | 30 |
| 9 Ausblick | 32 |
| Literaturverzeichnis | 33 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-------------------------------------|--|
| ABA | Abscisinsäure (<i>abscisic acid</i>) |
| ABH | Abscisinsäure-Hydroxylase |
| CO ₂ | Kohlendioxid |
| $\Delta^{13}\text{C}_{\text{Korn}}$ | Kohlenstoffisotop-Diskriminierung im Korn |
| DAI | Tage nach der Infektion (<i>days after infection</i>) |
| DAS | Tage nach der Aussaat (<i>days after sowing</i>) |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>) |
| GLS | Graue Blattfleckenkrankheit (<i>grey leaf spot</i>) |
| g_s | Stomataleitfähigkeit |
| Kb | Kilobasen |
| LER | Blattwachstumsrate (<i>leaf elongation rate</i>) |
| MAGIC | Multiparent Advanced Generation Intercross |
| Mb | Megabasen |
| NILs | nahezu isogene Linien (<i>near-isogenic lines</i>) |
| ns | nicht signifikant |
| QTL | Genomposition eines quantitativ vererbten Merkmals (<i>quantitative trait locus</i>) |
| RH | relative Luftfeuchtigkeit (<i>relative humidity</i>) |
| RP* | rekurrenter Elter (<i>recurrent parent</i>) |
| SD | Stomatadichte |
| SPAD | rel. Chlorophyllgehalt (mit <i>Soil Plant Analysis Development (SPAD) Meter</i>) |
| SWC | Bodenwassergehalt (<i>soil water content</i>) |
| TKG | Tausendkorngewicht |
| WNE | Wassernutzungseffizienz |

* rekurrenter Elter (RP) ist der genetische Hintergrund, der in aufeinanderfolgenden Rückkreuzungen verwendet wird, um ein gewünschtes Merkmal von einer anderen Linie (dem Donor-Elternteil, DP) auf diesen zu übertragen. RP ist somit der Hintergrund, der verwendet wurde, um die NILs zu erzeugen.

1 Kurzzusammenfassung

Unregelmäßige Niederschläge und zunehmend schwankende Temperaturen, die durch den Klimawandel verstärkt werden, wirken sich bereits jetzt negativ auf Wachstum und Ertrag aus. Die klimatischen Veränderungen können auch die Ausbreitung von Krankheitserregern verstärken und Pflanzen, die durch abiotischen Stress wie z. B. Trockenheit und Hitze geschwächt sind, können anfälliger für Krankheiten werden. Um den Einfluss verschiedener Eigenschaften der Spaltöffnungen (Stomata) auf die Resilienz von Mais gegenüber unterschiedlichen Stressfaktoren zu untersuchen, nutzten wir nahezu isogene Maislinien (NILs), die sich in ihrer Stomataleitfähigkeit, Stomatadichte und ihrem Abscisinsäure (ABA)-Stoffwechsel unterscheiden. ABA ist ein vielseitiges Pflanzenhormon, das u. a. die Reaktion auf Stress reguliert. In den hier beschriebenen Experimenten wurden Maislinien mit genetisch definierten Stomataeigenschaften kombinierten Stressfaktoren ausgesetzt. Dabei zeigte sich, dass durch geringere Stomataleitfähigkeit und Stomatadichte der Erreger der Grauen Blatfleckenkrankheit (GLS) langsamer in die Stomata eindringen konnte, aber hohe ABA-Gehalte späte Infektionssymptome möglicherweise erhöhen. Die Bedeutung einer reduzierten Stomataleitfähigkeit unter Trockenstress konnte validiert werden. Weiterhin wurde gezeigt, dass diese auch unter Hitzestress von Vorteil ist und dass erhöhte CO₂-Bedingungen den Einfluss der Stomataleitfähigkeit auf die intrinsische Wassernutzungseffizienz (iWNE) verstärken. Die genetische Zusammensetzung für Stomatadichte, welche die genutzten Linien besonders interessant macht, konnte aufgrund der polygenen Vererbung nur teilweise aufgeklärt werden. Die Genompositionen, die die Stomatadichte beeinflussen, konnten jedoch eingegrenzt werden. Des Weiteren wurde ein Diversitätspanel von acht züchtungsrelevanten Inzuchtlinien mit unterschiedlicher Stomataleitfähigkeit, Hitze- und Trockentoleranz untersucht. Die acht Inzuchtlinien wurden bezüglich ihrer Stomataeigenschaften und agronomischer Merkmale unter Kontroll- und Trockenstressbedingungen charakterisiert. Die im Projekt erfassten Daten bilden die Grundlage für die vertiefte Erforschung genetischer Faktoren, die die Anpassung an Trockenstress, Hitze und Pathogene beeinflussen. Zusammenfassend zielte dieses Projekt darauf ab, die komplexen Interaktionen zu entschlüsseln, die die Reaktionen von Mais auf Stressoren formen. Durch einen vielschichtigen Ansatz lieferte es vielversprechende Einblicke in die Rolle verschiedener Stomatamerkmale auf Ertrag und Widerstandsfähigkeit.

2 Einführung

Im Zuge des Klimawandels werden in Bayern immer stärkere Temperaturschwankungen und vermehrt unregelmäßige Niederschläge beobachtet. Es ist zu erwarten, dass dadurch die Wasserverfügbarkeit vieler landwirtschaftlicher Produktionsflächen reduziert wird und es somit zu verringerten Ernteerträgen kommt. Trockenperioden treten oft in Kombination mit extremen Temperaturen auf, was noch stärkere Auswirkungen auf das Pflanzenwachstum hat [1, 2]. Auf der anderen Seite könnte der prognostizierte Anstieg des CO₂-Gehalts in der Luft diese negativen Auswirkungen teilweise abmildern. Die klimatischen Veränderungen können jedoch auch die Ausbreitung von Pathogenen verstärken und Pflanzen, die durch abiotischen Stress bereits geschwächt sind, werden anfälliger für Krankheiten. Pflanzenwachstum und -ertrag sind daher abhängig von dem Zusammenspiel dieser abiotischen und biotischen Faktoren. Mais ist eine der wichtigsten Kulturpflanzen in Bayern. Ein besseres Verständnis der Prozesse, die der Reaktion von Mais auf kombinierte Stressfaktoren zugrunde liegen, ist für die Züchtung von Maispflanzen, die unter den sich ändernden Umweltbedingungen eine erhöhte Produktivität oder Resilienz aufweisen, von großer Bedeutung. Ziel des aktuellen Projekts ist es, durch die Kombination genetischer und physiologischer Ansätze zu diesem Verständnis beizutragen.

2.1 Die Rolle der Stomata bei der Reaktion von Pflanzen auf abiotischen Stress

Die Erhöhung der WNE von Nutzpflanzen ist besonders unter verringerter Wasserverfügbarkeit als Folge des Klimawandels von großer Bedeutung. Auf Pflanzenebene wird die WNE (WNE_{Pflanze}) als pflanzliche Biomasse, die pro verfügbare Wassermenge gebildet wird, definiert. Sie wird von der intrinsischen Wassernutzungseffizienz (iWNE) auf Blattebene beeinflusst. Diese wiederum wird hauptsächlich durch die Blattoberfläche, die sogenannten Stomata, gesteuert, die den Gasaustausch der Pflanze ermöglichen. Die iWNE ergibt sich aus dem Verhältnis von assimiliertem CO₂ zur Stomataleitfähigkeit (g_s , definiert als Leitfähigkeit der Blattstomata für Wasserverlust durch Transpiration). Unsere Gruppe konnte zeigen, dass Maisgenotypen mit mäßig reduzierter g_s , die zu einer erhöhten WNE auf Pflanzenebene führt, keine wesentliche Beeinträchtigung photosynthetischer Parameter und keine Wachstumsverluste aufweisen [3]. Diese Verbesserung der WNE kann auf veränderte Stomataeigenschaften wie reduzierte Öffnungsweite, -dichte oder -größe zurückgeführt werden.

Stomata spielen nicht nur eine zentrale Rolle für die Transpiration, sondern auch für die Photosynthese und die Temperaturregelung der Blätter. Es ist daher zu erwarten, dass eine reduzierte g_s nicht nur die Toleranz der Pflanze gegenüber Wassermangel erhöht, sondern auch die Toleranz gegenüber Temperaturextremen (Kälte und Hitze) beeinflusst. Unter Hitzestress zeigt Mais eine Reduktion der g_s , die zu einer Herabsetzung der Photosyntheserate führt. Übermäßige Hitze führt neben der Verringerung der Nettophotosynthese auch zu einer Reduktion der Blattfläche, einer geringeren Biomasseakkumulation sowie je nach Zeitpunkt des Hitzestresses auch zu einem geringeren Kornansatz und einem geringeren Korngewicht [4, 5]. Ähnliche negative Effekte werden auch unter Kältestress beobachtet [6]. Eine erhöhte

CO₂-Konzentration in der Atmosphäre, wie sie für das Jahr 2100 prognostiziert wird, wirkt dagegen in C₃- [7, 8, 9] und in C₄-Pflanzen wachstumsfördernd und verringert die negativen Auswirkungen von Wassermangel [10, 11, 12]. Inwieweit eine Verbesserung der WNE, die auf veränderten Stomataeigenschaften basiert, die Resistenz von Mais gegenüber verschiedenen Stressfaktoren, sowie der Kombination von Trockenheit mit Temperaturextremen oder erhöhter CO₂-Konzentration beeinflusst, ist bisher noch unklar.

2.2 Die Rolle der Stomata bei der Reaktion von Pflanzen auf biotischen Stress

Stomata spielen nicht nur bei der abiotischen Stressantwort, sondern auch bei der Abwehr von Krankheitserregern eine zentrale Rolle. Das Schließen der Stomata ist ein früher Abwehrmechanismus gegen das Eindringen von Krankheitserregern in die Blätter. Die Dichte und Größe der Stomata beeinflussen die Anfälligkeit von Pflanzen gegenüber einer Infektion mit Krankheitserregern [13]. Unter kombiniertem biotischem und abiotischem Stress zeigen Pflanzen spezifische Abwehrreaktionen, die nur in diesem Szenario beobachtet werden können [14]. Um die Rolle, die Stomata bei diesen Reaktionen spielen, besser zu verstehen, haben wir *Cercospora zea-maydis* ausgewählt, einen nekrotrophen Pilz, der durch die Stomata in Maisblätter eindringt und graue Blattflecken (*grey leaf spots*) verursacht [15]. Die Graue Blattfleckenkrankheit (GLS) von Mais ist in vielen Regionen, insbesondere in den östlichen USA, Südamerika und Afrika, ein schwerwiegendes Problem, das den Biomasseertrag verringert [16]. Derzeit ist GLS in Europa nicht weit verbreitet, jedoch könnte sich dies im Zuge des Klimawandels ändern.

2.3 Experimentelle Maislinien zur Bestimmung der Rolle der Stomataeigenschaften bei kombinierten Stressfaktoren

Die genetische und genomische Variation zwischen verschiedenen Maislinien ist sehr groß und hat einen Einfluss auf trockenstressrelevante Merkmale. Bei Verwendung von definiertem genetischem Material, wie NILs oder Mutanten, ist die Variation des genetischen Hintergrunds minimal. Dadurch ist es möglich, Merkmale mit spezifischen Genomregionen in Beziehung zu setzen, die beteiligten Gene zu identifizieren und zugrunde liegende molekulare Mechanismen aufzudecken. In umfangreichen Vorarbeiten konnte unsere Gruppe NILs generieren, deren Introgressionen verschiedene Stomataeigenschaften beeinflussen [17] (**Abbildung 1**). Es wurden zwei genomische Regionen von jeweils 8 Mb und 200 kb definiert, die mit der Stomatadichte (SD) bzw. der g_s assoziiert sind (**Abbildung 1**). NIL_N und G_1, die eine Introgression von einem Donorelter in der 8 Mb-Zielregion tragen, zeigen eine höhere SD als der rekurrente Elter (RP), während NIL_M, dessen Introgression lediglich die 200 kb-Region umfasst, keine höhere SD als RP aufweist. NIL_I, G_2 und B, die Introgressionen in beiden Segmenten tragen, zeigen sowohl eine erhöhte SD als auch g_s im Vergleich zu RP (**Abbildung 1**). Diese NILs sollten unter Einwirkung verschiedener veränderter Umweltfaktoren analysiert werden, um herauszufinden, wie unterschiedliche Stomataeigenschaften die Pflanzenreaktion auf biotischen und abiotischen Stress beeinflussen.

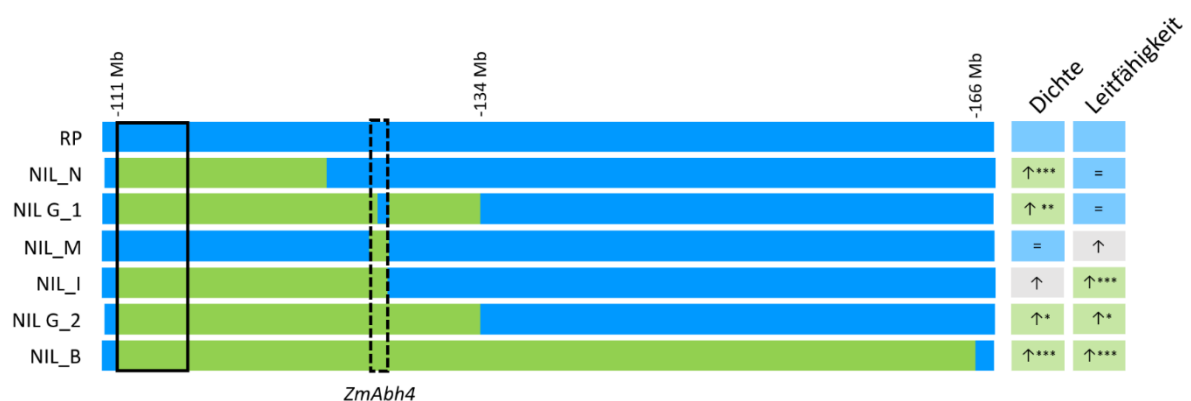


Abbildung 1: Genetische Konstitution der NILs. Dargestellt ist eine 55 Mb-Region auf Chromosom 7, in welcher sich die sechs nahezu isogenen Maislinien (NILs) und der rekurrente Elter (RP) unterscheiden. Regionen, die dem Allel des RPs entsprechen sind in blau dargestellt, die dem Allel des Donorelter entsprechen in grün. Das schwarze Rechteck markiert die 8 Mb-Region, die mit SD assoziiert ist. Das gestrichelte schwarze Rechteck markiert die 200 kb-Region, in der sich das Gen *ZmAbh4* befindet. Das Schema ist nicht skaliert. Stomatadichte und -leitfähigkeit wurden mit RP verglichen und die relative Veränderung wird durch Pfeile angezeigt ($p < 0,05$).

Neben der Untersuchung von definiertem isogenem Material ermöglichen Analysen in Mais-Diversitätspanels die Bestimmung der allelischen Diversität von Genen und die Bewertung ihres züchterischen Potenzials in verschiedenen genomischen Hintergründen. Acht Dent-Inzuchtlinien wurden im Rahmen des EU-Projekts „DROPS“ (INRAE, Frankreich) aufgrund unterschiedlicher Resistenz gegenüber Trockenheit und Hitzestress als Elternlinien einer MAGIC-Population (*Multiparent Advanced Generation Intercross*) ausgewählt, die der Identifizierung von Loci eines quantitativ vererbten Merkmals (QTL) für Trockenresistenzmerkmale dienen können. Darüber hinaus unterscheiden sich die acht Inzuchtlinien in ihrer g_s [18]. Die Analyse dieser acht Linien unter verschiedenen Stressbedingungen sollte dazu beitragen, die Bedeutung der Stomata für die Stressreaktion in Material mit hoher genetischer Diversität zu verstehen. Damit kann das Potenzial natürlicher Ressourcen besser genutzt und für züchtungsrelevante Vorhaben charakterisiert werden.

3 Zielstellung

Das Projekt zielte darauf ab, das komplexe Zusammenspiel zwischen Stomataeigenschaften und Umweltstress beim Mais zu verstehen und innovative Ansätze zur Verbesserung der Trockenstressresistenz zu entwickeln. Durch die Untersuchung von NILs mit differenzierten Stomataeigenschaften sowie einem Diversitätspanel aus acht Dent-Inzuchtlinien sollte geklärt werden, inwieweit eine Verbesserung der WNE durch Veränderung der Stomataeigenschaften auch die Resistenz gegenüber anderen Stressfaktoren beeinflusst. Dies betrifft insbesondere die Kombination von Trockenheit mit weiteren Stressfaktoren, einschließlich Pathogeninfektion, Hitze und erhöhtem CO₂.

Die Hauptziele dieses Projekts waren die Bestimmung des individuellen und gemeinsamen Einflusses verschiedener Stomatamerkmale (Leitfähigkeit und Dichte) auf die WNE und die Anpassung der Pflanze an veränderte klimatische Stressbedingungen unter Verwendung genau definierter genetischer Materialien. Zudem sollte die allelische Diversität des *ZmAbh4*-Gens und der Beitrag der Stomataleitfähigkeit zur Stressresistenz in verschiedenen genomischen Hintergründen untersucht werden. Darüber hinaus sollten die NILs und die acht Dent-Inzuchtlinien im Gewächshaus evaluiert werden, um ein Verständnis für die Funktion von Stomata bei der Stressantwort in späteren Entwicklungsstadien zu gewinnen. In Feldversuchen sollten schließlich die Korrelation zwischen Stressresistenz und Ertrag analysiert und die direkte züchtungsrelevante Bedeutung von Stomataeigenschaften und WNE im Kontext des Klimawandels bewertet werden. Die Daten dieser Experimente werden dazu beitragen, das Potenzial verschiedener Stomatamerkmale als Zuchtmerkmale zu beurteilen.

Dieses Projekt sollte ein verbessertes Verständnis der Rolle von Stomataeigenschaften bei der Bewältigung verschiedener Umweltbedingungen schaffen und somit die Möglichkeit geben, wassernutzungseffiziente und stressresistente Nutzpflanzen zu züchten, um das Risiko von Ertragsausfällen in Bayern zu verringern.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Klimakammerexperimente (AP1)

4.1.1 Optimierung biotischer Stress (A1)

Das Ziel des Projekts war es, den Einfluss verschiedener Stomataeigenschaften wie SD und g_s auf Ertrag und Wachstum von Mais unter verschiedenen Umweltbedingungen zu verstehen. Da Stomataeigenschaften stark von Umweltfaktoren abhängen und die Variation zwischen NILs auf spezifische Genombereiche fokussiert ist, haben wir die Anzahl der Replikate erhöht, um Unterschiede zwischen Genotypen statistisch absichern zu können. Wir haben RP, NIL_B, NIL_M und NILG_1 für die Stressexperimente ausgewählt, da diese verschiedene Kombinationen von Eigenschaften aufweisen: NIL_B hat im Vergleich zu RP eine erhöhte g_s und SD , NILG_1 hat eine erhöhte SD und dieselbe Leitfähigkeit wie RP und NIL_M zeigt dieselbe SD wie RP, jedoch eine erhöhte Leitfähigkeit ([Abbildung 1](#)).

In früheren Experimenten waren die *abh4*-Mutante und ihre zugrunde liegende Linie (B104) in die Experimente miteinbezogen worden, um die Funktion des *ZmAbh4*-Gens besser zu verstehen. Der Unterschied in der g_s zwischen Mutante und B104 ist jedoch geringer als der zwischen NIL_B und RP. Die Reaktionen der NILs und der *abh4*-Mutante auf Stress variierten ebenfalls aufgrund von Unterschieden im genetischen Hintergrund, weshalb wir für die Etablierung von Stressbedingungen ausschließlich NILG_1, NIL_M, NIL_B und RP nutzten.

Cercospora zea-maydis dringt durch die Stomataöffnungen in Maisblätter ein und verursacht GLS-Symptome, die nach fünf Tagen auf den Blättern sichtbar werden [19]. In einer anderen Studie wurde gezeigt, dass Mo18W resistent gegenüber GLS ist, wohingegen B73 anfällig ist [4] und viele QTL an der Resistenz beteiligt sind [20]. Um ein besseres Verständnis von der Bedeutung verschiedener Stomataeigenschaften während der Infektion zu erlangen, haben wir Stomataleitfähigkeit, -dichte und -fläche zwischen drei NILs, RP, B73 und Mo18W verglichen. Wie erwartet zeigten RP und NILG_1 eine niedrigere g_s als NIL_B und NIL_M ([Abbildung 2A](#)) und NIL_B und NILG_1 hatten im Vergleich zu RP und NIL_M eine erhöhte SD ([Abbildung 2B](#)). B73 (anfällig für GLS) zeigte eine höhere g_s , Dichte und Fläche im Vergleich zu Mo18W (resistent gegen GLS; [Abbildung 2](#)). Das Protokoll zur optimierten Infektion wurde im Laufe der Experimente entwickelt. Das erwünschte Wachstum der Pilzkulturen wurde nach 12-tägiger Inkubation mit 12 h Tag/Nacht-Rhythmus in V8-Medium ermöglicht und erzeugte eine Suspensionsdichte von 1×10^5 Konidien/ml.

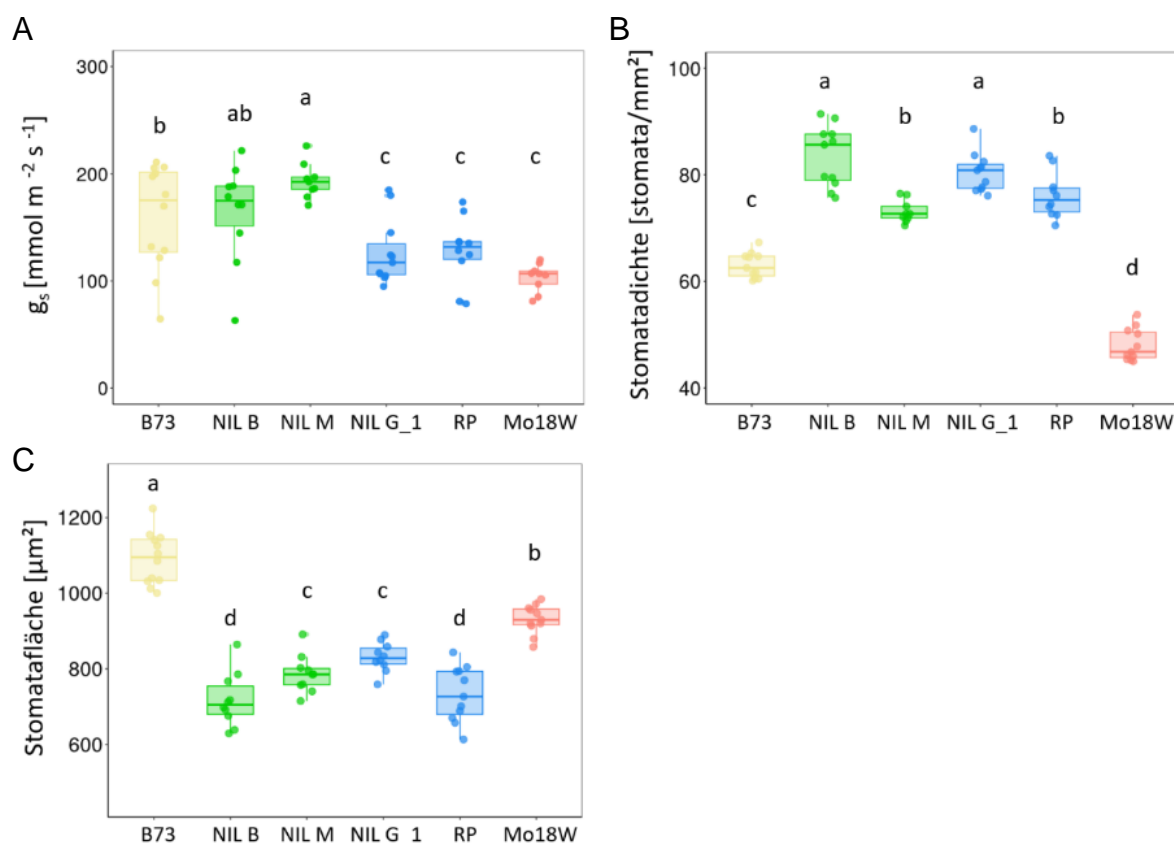


Abbildung 2: Stomataeigenschaften von NILs, RP, B73 und Mo18W. Die Stomataleitfähigkeit (g_s ; A) wurde mit einem Blatt-Porometer an Blatt 5 gemessen. SD (B) und Stomatafläche (C) wurden ebenfalls an Blatt 5 bestimmt. Unterschiede wurden mittels Varianzanalyse, gefolgt von einem LSD-Post-hoc-Test ($p < 0,05$) auf Signifikanz getestet. Signifikante Unterschiede zwischen den Genotypen sind mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichnet.

4.1.2 Klimakammerexperiment biotischer Stress (A2)

Unsere Hypothese war, dass Pflanzen mit höherer SD und g_s höhere Anfälligkeit gegen GLS zeigen. Um diese Hypothese zu testen, infizierten wir die verschiedenen Genotypen in einer Klimakammer. Die Pilzkultur wurde auf beiden Blattseiten aufgetragen und die Pflanzen anschließend für 4 Tage in einen Bereich mit 90-100% Luftfeuchtigkeit übertragen. Zwanzig Pflanzen jedes Genotyps wurden infiziert und die Menge an Pilz-DNA 14 oder 21 Tage nach der Infektion (*days after infection*, DAI) quantifiziert [21]. Die infizierten Bereiche wurden fotografiert, um die von GLS betroffene Fläche zu bestimmen. Fünf Pflanzen jedes Genotyps wurden als Kontrollen behandelt und zeigten keine Infektionssymptome. B73 (anfällig) zeigte im Vergleich zu Mo18W (resistent) eine höhere Pilz-DNA-Menge pro Blatt ([Abbildung 3A](#)) und einen höheren GLS-Score ([Abbildung 3B](#)). Die Infektionsraten von NIL_B waren die höchsten unter den NILs ([Abbildung 3](#)), was unsere Hypothese bestätigt, dass Pflanzen mit höherer g_s und SD stärker von einer *Cercospora zeaе-maydis*-Infektion betroffen sind. Dass NIL_M einen tendenziell erhöhten GLS-Score aufwies als RP und NILG_1, könnte darauf hindeuten, dass g_s für die Infektion relevanter ist als SD. Die Infektionsraten innerhalb eines

Genotyps waren sehr variabel. Um unsere Ergebnisse zu prüfen und die Rolle der Stomata bei der Infektion besser zu verstehen, wurde die Intensität der Infektion in den folgenden Experimenten erhöht und eine Boniturskala für die verbesserte Datenerhebung des Krankheitsverlaufs eingeführt.

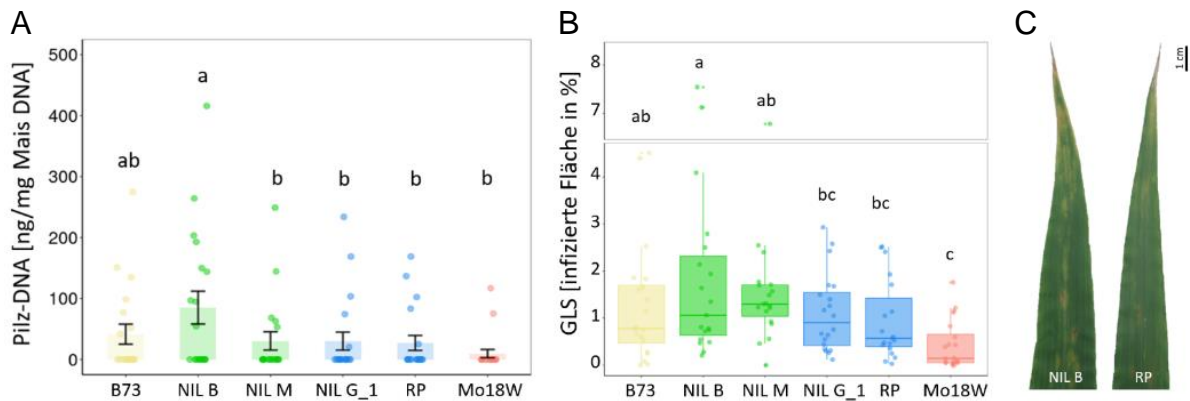


Abbildung 3: Infektionsraten von NILs, B73 und Mo18W. Blätter wurden mit 8×10^4 Konidien/ml infiziert und 14 Tage nach der Infektion (DAI) geerntet. Die Pilz-DNA-Quantifizierung (A) wurde nach Korsman et al. (2012) [21] durchgeführt. GLS wurde anhand von zwanzig Blättern pro Genotyp unter Verwendung von APS Assess 2.0 quantifiziert (B). Kontrollpflanzen zeigten kein GLS (Daten nicht gezeigt). Der Vergleich zwischen den Genotypen wurde anhand einer Varianzanalyse durchgeführt, gefolgt von einem LSD-Post-Hoc-Test ($p < 0,05$). Signifikante Unterschiede zwischen den Genotypen sind mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichnet. Darstellung repräsentativer Blätter mit Infektion von NIL_B und RP (C).

Unter Anwendung der Boniturskala war es möglich, die Entwicklung über den gesamten Infektionsverlauf zu verfolgen. Wir konzentrierten uns auf zwei Genotypen, die in ihren Stomataeigenschaften am stärksten variierten: RP und NIL_B. Die Blätter 6, 7 und 8 von RP, NIL_B und B73 wurden infiziert und der Krankheitsverlauf alle drei Tage aufgezeichnet. Mit der Boniturskala definierten wir individuell die Ausprägung von Chlorose (hypersensitive Reaktion) und Nekrose (Zelltod) sowie GLS als Summe beider. Der Infektionszeitraum wurde um 7 Tage erweitert (21 DAI), um Kurz- und Langzeiteffekte besser beurteilen zu können. Während des gesamten Infektionsprozesses zeigten NIL_B und B73 mehr chlorotische Blattbereiche als RP, während die Nekrosebereiche für alle Genotypen ähnlich bewertet wurden (Abbildung 4A, 4B). Insgesamt spiegelt die GLS-Bewertung den Krankheitsverlauf gut wider, und RP hat gegenüber NIL_B zu Beginn der Infektion Vorteile, die jedoch im Verlauf der Infektion verloren gehen (Abbildung 4C). Die Nekrose-Bewertung korreliert mit der Menge an Pilz-DNA (21 DAI), und zeigt, dass RP stärker infiziert war als NIL_B (Abbildung 4D). In dem vorherigen Experiment zeigte NIL_B eine höhere Infektionsrate als RP nach 14 Tagen (Abbildung 3A). Diese Ergebnisse zeigen, dass die Infektion in RP über den erweiterten Zeitraum stärker ausgeprägt wird (14 bis 21 DAI). Auch wenn Unterschiede in der Resistenz nicht ausschließlich von Stomataeigenschaften abhängen, bestätigten die Ergebnisse einer höheren Infektion bei höherer Dichte und Öffnung der Stomata unsere Hypothese. Geringere g_s und SD scheinen das Eindringen von *C. zea-maydis* in die Blätter zu verhindern, ein hö-

herer ABA-Spiegel könnte jedoch den Infektionsverlauf fördern. Der Literatur zufolge unterdrückt ABA immunologische Reaktionen gegen nekrotrophe Pathogene in Tomaten [22], Arabidopsis [23] und Zuckerrüben [24]. Im letzten Fall unterdrückte die ABA-Akkumulation am Infektionsort die pflanzliche Abwehr gegen *Cercospora beticola*. Dies war auch hier analog mit einer höheren ABA-Menge in RP über einen längeren Zeitraum zu beobachten und verdeutlicht die Qualität des genetischen Materials für die Charakterisierung von ABA und Stomatamerkmale für die Stressresilienz gegenüber Pathogenen.

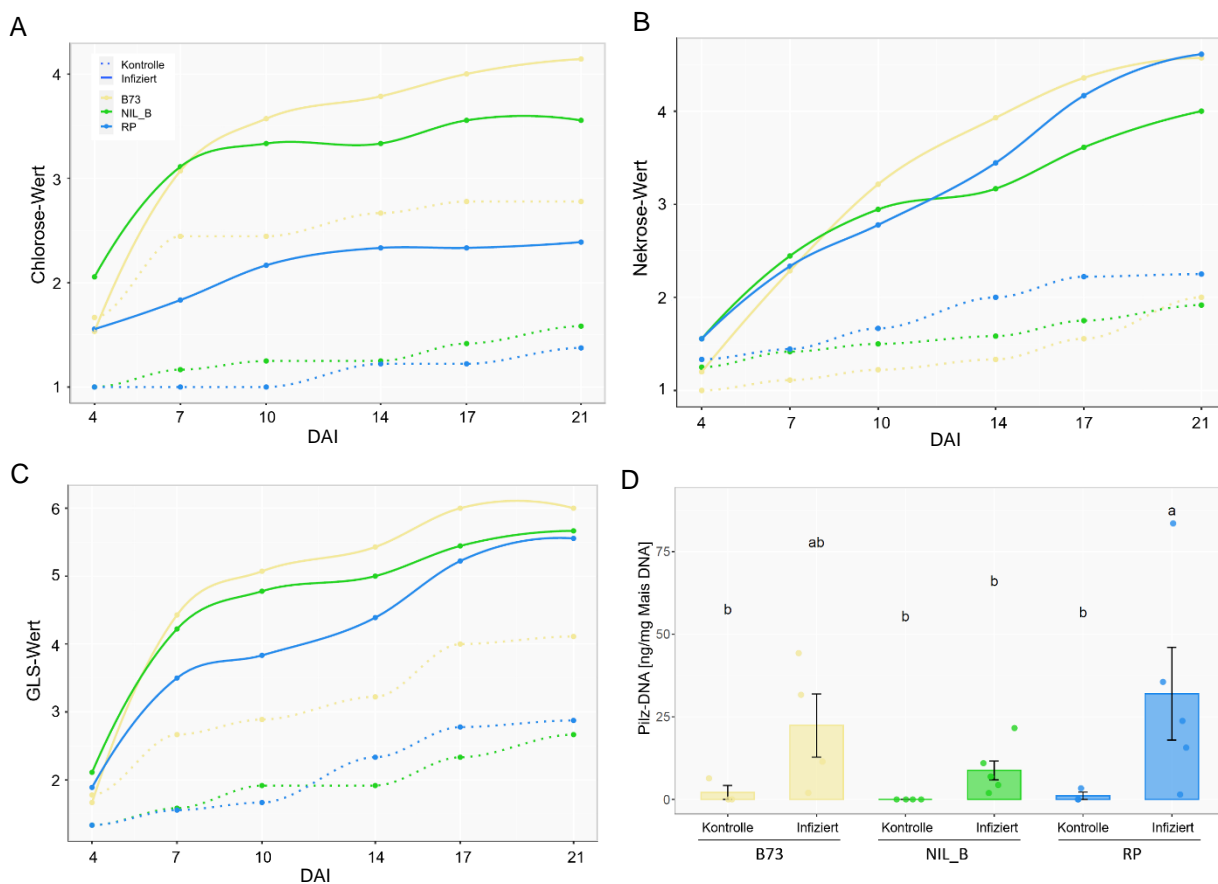


Abbildung 4: Krankheitsverlauf mit Boniturskala für Chlorose (A), Nekrose (B), und GLS (C) sowie Pilz-DNA Menge (D). Infizierte Blätter wurden in regelmäßigen Abständen (3-4 Tage) bewertet (4 bis 21 DAI). Die Datenpunkte repräsentieren den Mittelwert jedes Tages (A-C) von mindestens drei unabhängigen Pflanzen. Pilz-DNA wurde extrahiert und nach Korsman et al. (2012) [21] zum Vergleich mit Kontroll-Blättern herangezogen (D). Der Vergleich zwischen den Genotypen wurde anhand einer Varianzanalyse durchgeführt, gefolgt von einem LSD-Post-Hoc-Test ($p < 0,05$). Signifikante Unterschiede zwischen den Genotypen sind mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichnet.

4.1.3 Klimakammerexperimente Trockenstress + Kälte (A3)

Es zeigte sich in Vorversuchen, dass mit den vor Ort vorhandenen Geräten die nötige Temperatur (10 °C) nicht konstant gehalten werden konnte und aus lehrstuhleigenen Haushaltsmitteln ein Klimaschrank mit passenden Bedingungen beschafft werden musste. Daher kam

es zu Verzögerungen. Die Versuche zu Trockenstress und Kälte sind deshalb noch nicht abgeschlossen.

4.1.4 Klimakammerexperimente Trockenstress + Hitze (A4)

Um die Experimente zu Stresskombinationen in A4 zu ermöglichen, mussten zunächst die Einzelfaktoren Trockenstress und Hitze separat etabliert werden. In Studien wurde gezeigt, dass Temperaturen von 35 °C am Tag und 25 °C in der Nacht bei Mais in der reproduktiven Phase Hitzestress auslösen können [5]. Mit dem Ziel, einen milden Hitzestress hervorzurufen, haben wir RP, NILG_1, NIL_M und NIL_B in einer Klimakammer für zwei Tage den oben genannten Temperaturen ausgesetzt. Mit einem LI-6800 (LI-COR) wurden Gasaustauschparameter gemessen, um die Rolle der verschiedenen Stomataeigenschaften von Mais unter Hitzestress besser zu verstehen. Weder zwischen NIL_B und RP noch zwischen den anderen NILs wurden Unterschiede in g_s oder der CO_2 -Assimilation beobachtet. Auch für die iWNE konnte unter Kontrollbedingungen oder bei 35 °C Hitze kein signifikanter Unterschied für die NILs festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Technische Anpassungen für die Datenerhebung mit LI-6800 wie Messtemperatur konnten die Varianz der Daten und Effekte der Genotypen stabilisieren. Um Unterschiede in den Reaktionen auf Hitzestressbedingungen zwischen den NILs detektieren zu können, wurden die folgenden Experimente mit höherer Temperatur und längerer Inkubationszeit durchgeführt.

Trockenstress resultiert aus dem Ungleichgewicht zwischen Bodenwassergehalt (*soil water content*, SWC), Transpiration und Bedarf der Pflanzen an Wasser. Die Transpiration hängt dabei stark von der relativen Luftfeuchtigkeit (*relative humidity*, RH) ab. Es wurde gezeigt, dass Mais unter Wassermangel die SD erhöht und die Stomatagröße verringert [25]. Diese Anpassungen ermöglichen schnellere Stomatabewegungen und helfen Pflanzen den Wasserverlust zu reduzieren. Wir haben ein Klimakammerexperiment durchgeführt, um zu verstehen, wie sich Maislinien mit unterschiedlichen Stomataeigenschaften unter Trockenstress bei hoher (90 %) und niedrigerer (60 %) RH entwickeln und wie Stomata auf den Trockenstress reagieren. Die Genotypen RP, NILG_1, NIL_M und NIL_B wurden in Töpfe mit einem SWC von 90 % gesät und der SWC täglich bestimmt. Das Experiment fand in zwei Klimakammern mit jeweils 60 und 90 % RH statt. 11 Tage nach der Aussaat (*days after sowing*, DAS) erreichten alle Pflanzen einen SWC von 60 %. Im folgenden Verlauf wurden Kontrollpflanzen täglich auf 60 % SWC angepasst und die übrigen Pflanzen steigendem Trockenstress ausgesetzt (**Abbildung 5**). Bei 35 % SWC wurde ein Grenzwert für moderaten Trockenstress definiert. Mit 60 % RH erreichten RP und NILG_1 diesen Wert nach 17,5 Tagen und NIL_B und NIL_M nach 17 Tagen. Eine höhere RH (90 %) konnte die Differenz verstärken, sodass NIL_B/NIL_M bereits nach 16,5 Tagen bei 35 % SWC lagen und RP/NILG_1 nach 18 Tagen diese Phase erreichten (**Abbildung 5**).

NILs mit ähnlicher g_s zeigten einen ähnlichen Verlauf beim Wasserverlust, was besonders in der Klimakammer mit höherer relativer Luftfeuchtigkeit zu beobachten ist (**Abbildung 5**). NIL_B und NIL_M verloren aufgrund der höheren g_s schneller Wasser. Selbst unter Kontrollbedingungen verlor NIL_B mehr Wasser als die anderen NILs. Interessanterweise verlor NIL_M unter leichtem Stress (35-45 % SWC) schneller Wasser als NIL_B, wohingegen unter starkem Stress (35 % SWC) NIL_B einen höheren Wasserverlust aufwies als NIL_M. Dies

könnte darauf hinweisen, dass eine reduzierte SD unter leichtem Trockenstress kein Vorteil bringt, sich bei starkem Wassermangel aber positiv auswirkt.

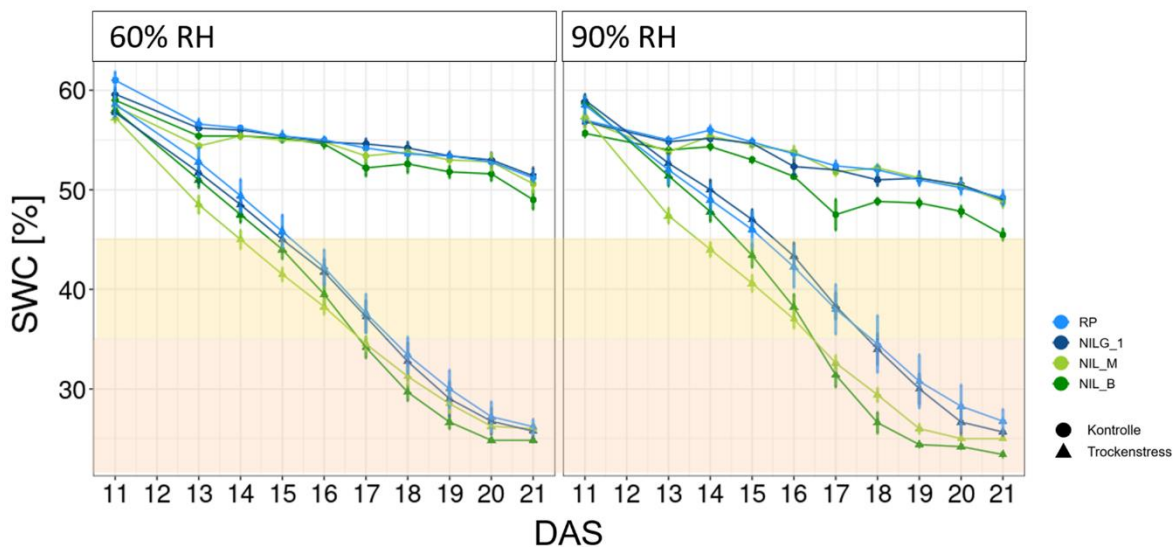


Abbildung 5: Abnahme des Bodenwassergehalts (SWC) bei Trockenstress. Der gravimetrische SWC ist für den Zeitraum von 11 bis 21 Tagen nach Aussaat (DAS) dargestellt und wurde täglich basierend auf dem Gewicht der Töpfe bestimmt. NILs und RP wuchsen bei 60% (A) oder 90% (B) relativer Feuchtigkeit (RH). Proben mit Trockenstress wurden mit Dreieck, Kontrollpflanzen (60% SWC) mit Kreis markiert. Gezeigt ist der Standardfehler von n=10 Stichproben.

Die Blattwachstumsrate (LER) ist ein Parameter, der bei Pflanzen Stress widerspiegelt, da gestresste Pflanzen das Wachstum der Blätter reduzieren [26]. Interessanterweise war die Blattwachstumsrate von NIL_B und NIL_M unter Trockenstress sowohl bei 60 als auch 90 % RH ähnlich stark reduziert (-38 % und -37 %, [Abbildung 6](#)). NILG_1 reduzierte die Blattwachstumsrate um 21 % und RP nur um 4 %, beide waren jedoch bei hoher RH stärker betroffen und reduzierten das Wachstum um 33 % und 23 %. Dies deutet darauf hin, dass RP und NILG_1 besser mit Trockenstress umgehen, was mit der zuvor gezeigten höheren iWNE dieser Linien übereinstimmt.

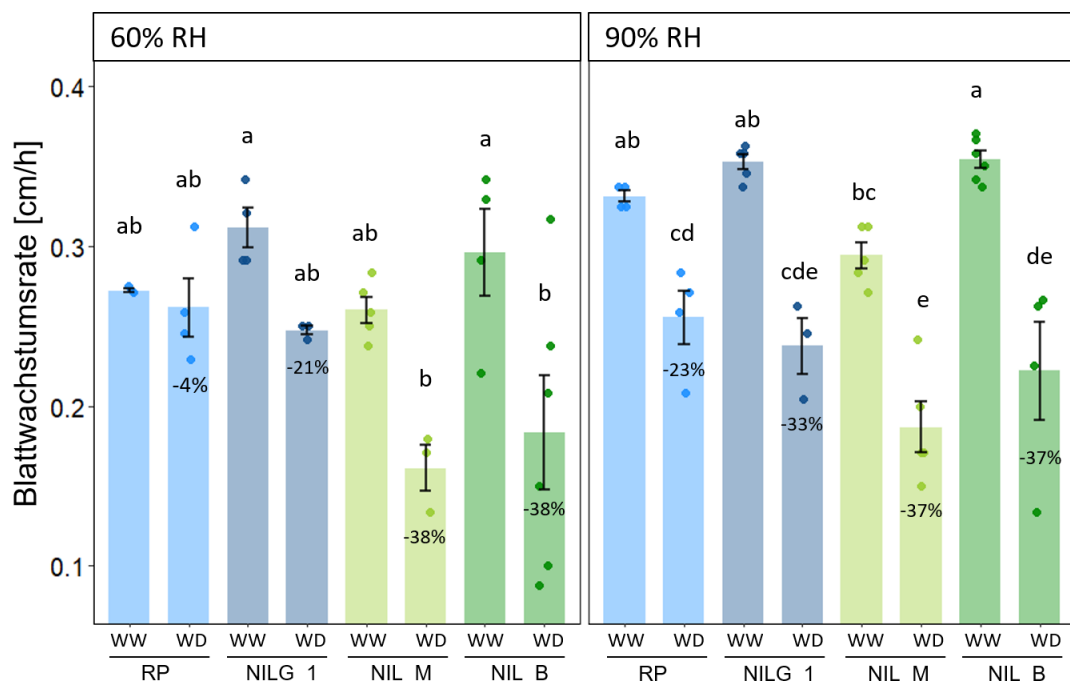


Abbildung 6: Blattwachstumsrate unter Kontrollbedingungen und unter Trockenstress. Die Blattlänge von Blatt 6 (Primärblatt bei 35 % SWC) wurde im 24-Stunden-Intervall gemessen und die Blattwachstumsrate (LER) wurde als Blattlänge pro Stunde berechnet. Die prozentuale Verringerung der LER von trockengestressten Pflanzen gegenüber Kontrollpflanzen ist in der Grafik angegeben. Die Pflanzen wuchsen bei 60 % oder 90 % relativer Feuchtigkeit (RH). Es wurde eine Varianzanalyse und LSD Post-Hoc-Test durchgeführt ($p < 0,05$) und signifikante Unterschiede sind mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichnet.

Stomatale Modulation ist eine Anpassung an Umweltveränderungen mit dem Versuch, die Auswirkungen einer verringerten Wasserverfügbarkeit abzumildern [25]. Bei Mais ist bekannt, dass eine Reduktion der Stomatagröße und eine Erhöhung der Dichte unter Trockenbedingungen vorteilhaft sind, da kleinere Stomata eine schnellere Kinetik aufweisen und verschiedene Teile der Blätter ihre Öffnung besser modulieren können [25]. Bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 60% modulierte RP seine Stomata am wenigsten, was mit den LER-Ergebnissen übereinstimmt, die zeigen, dass RP die am wenigsten gestresste Linie war, während die anderen NILs deutlich eingeschränkt waren (Abbildung 7). Die Luftfeuchtigkeit hatte einen Einfluss darauf, wie die Stomataeigenschaften zur Stressanpassung moduliert werden, was besonders bei RP deutlich wurde, wo signifikante Unterschiede zwischen Feuchtigkeitsniveaus von 60 und 90 % RH festgestellt wurden. Bei den anderen NILs war eine ähnliche Modulation der Stomataeigenschaften unter Trockenstress zu beobachten, unabhängig von den Feuchtigkeitsniveaus. Dies lässt sich durch ein niedriges Sättigungsdefizit in der Kammer und deren Auswirkungen auf die Stomataentwicklung erklären. Es ist bekannt, dass große Unterschiede im Sättigungsdefizit zu einer Modulation in der SD führen können [27]. Der beobachtete Effekt deutet an, dass ABA und SD einen wesentlichen Teil der Anpassung ausmachen und der Einfluss der Transpiration auf die Stomatamodulation, vermittelt über das Sättigungsdefizit, mit den genutzten NILs bestimmt werden konnte.

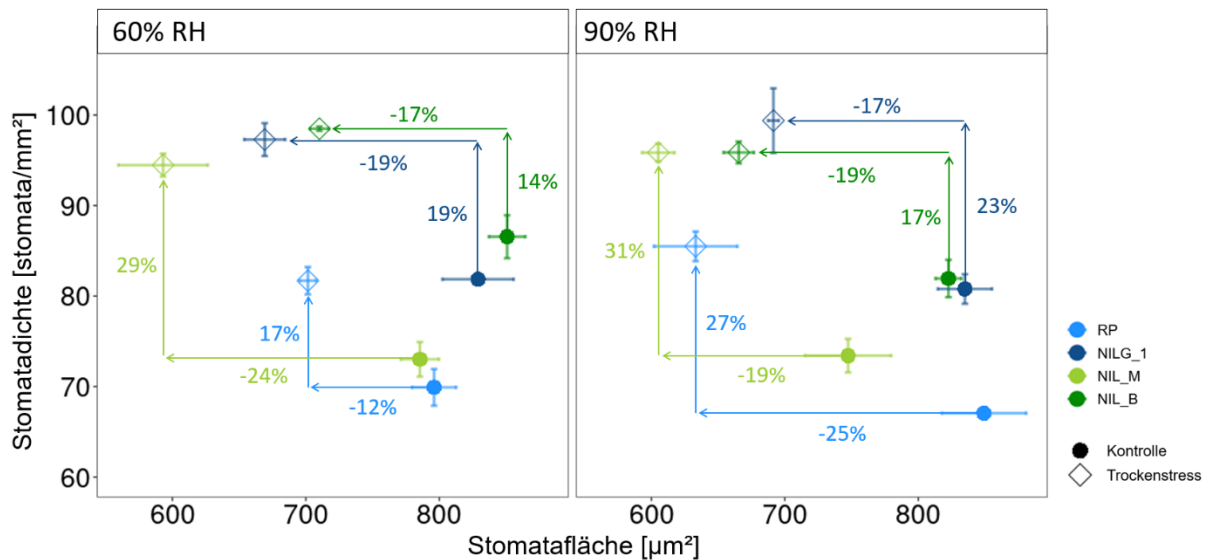


Abbildung 7: Stomatamodulation unter Trockenstress. Stomatadichte und -größe wurden für Kontrollpflanzen (Kreis) und gestresste Pflanzen (Raute) am 5. Blatt erfasst. Prozentangaben repräsentieren die Zu- oder Abnahme vom Mittelwert der entsprechenden Bedingungen. Der Stichprobenumfang beträgt $n=5$. Statistische Varianz ist als Standardfehler aufgetragen. Die Pflanzen wuchsen bei 60% oder 90% relativer Feuchtigkeit (RH).

Im nächsten Experiment sollte die Wirkung verschiedener ABA-Spiegel und g_s auf eine Kombination aus mehreren Stressfaktoren herausgearbeitet werden. Dazu wurden die Linien RP und NIL_M untersucht. Diese genetischen Linien unterscheiden sich lediglich in einem Segment von 200 kb auf Chromosom 7, was dazu führt, dass NIL_M im Vergleich zu RP eine höhere g_s aufweist und gleichzeitig niedrigere ABA-Konzentrationen in den Blättern vorliegen. Die Pflanzen wurden im V5-Stadium Kontrollbedingungen, Hitzestress, Trockenstress und einer Kombination aus letzteren ausgesetzt. Als Bedingung für Hitzestress wurden 38/30 °C im Langtag/Nacht-Zyklus über 5 Tage gewählt, um stärkere Phänotypen als in der Etablierungsphase zu erzeugen. Trockenstress wurde analog über 5 Tage angesetzt, wobei nach 2 Tagen ein SWC von 35% erreicht wurde, der über die folgenden Tage konstant gehalten wurde. Diese individuellen Bedingungen können als milde Stressbedingungen betrachtet werden. Schließlich wurden die Pflanzen einer kombinierten Hitze- und Trockenheitsbelastung ausgesetzt, die sich aus den genannten Bedingungen über 5 Tage ergibt.

Sowohl RP als auch NIL_M zeigten verringerte Wuchshöhe und Blattwachstumsrate unter individuellen und kombinierten Stressbedingungen, was darauf hinweist, dass die Pflanzen unterschiedlichen Stressbedingungen ausgesetzt waren (Daten nicht gezeigt). Es wurden jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen hinsichtlich dieser Merkmale gefunden. Wie erwartet zeigte NIL_M unter Kontrollbedingungen eine höhere g_s als RP, jedoch glichen sich unter Stress beide Genotypen an (Abbildung 8A). Dieses Muster zeigte sich auch für die iWNE (Abbildung 8B). Es deutete sich jedoch eine Tendenz an, bei der RP unter Trockenheit und in der kombinierten Hitze- und Trockenheitsbelastung wasserökonomischer ist. Über längere Stressperioden könnten diese geringfügigen Vorteile sich verstärkt

äußern, sodass weiterführende Studien mit Blick auf Langzeiteffekte nötig sind, um dieses Phänomen genauer zu untersuchen. Die Photosyntheseparameter F_v/F_m und SPAD waren für beide Genotypen unter allen Stressbedingungen, mit Ausnahme von NIL_M unter Hitze- stress, im Vergleich zur Kontrolle gleichermaßen reduziert (Abbildung 8C und D). Dies könnte darauf hindeuten, dass NIL_M mit höherer g_s Vorteile beim Stabilisieren der Photosynthesemaschinerie unter Hitzestress hat. Auch hier sind weiterführende Experimente nötig, die die Blattemperatur und so den Zusammenhang von Temperaturregulation und Stomataeigenschaften genauer beleuchten. Die Experimente zu Hitze- und Trockenstress konnten mit dem untersuchten genetischen Material erste Ergebnisse für die zeitliche Korrelation von Stomatakinetik und Dichte zu Stresskombinationen liefern. Die Ergebnisse verdeutlichen die kumulative sowie separate Wirkung von Hitze und Trockenheit auf die WNE und wie SD mit g_s synergistisch für eine definierte Stressantwort genutzt werden könnten.

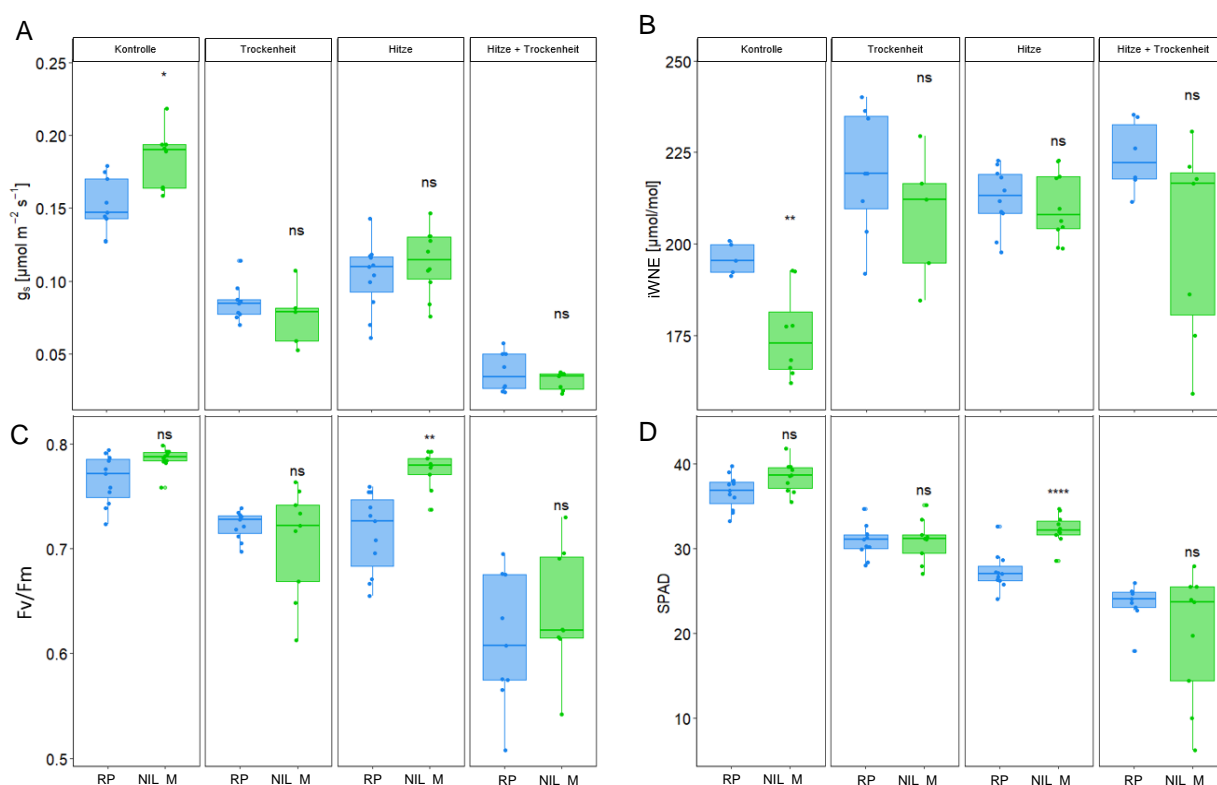


Abbildung 8: Stomataleitfähigkeit (g_s , A), iWNE (B), F_v/F_m (C) und SPAD (D) aus Messungen mit Einzelstress und kombiniertem Hitze- und Trockenstress. Alle Parameter wurden am 5. Blatt gemessen und entsprechen $n=10$ Replikaten. Signifikante Unterschiede zwischen RP und NIL M wurden mit einem t-Test ermittelt (ns = no significance, * = $p<0,05$, ** = $p<0,01$, *** = $p<0,005$, **** = $p<0,001$).

4.1.5 Klimakammerexperimente Trockenstress + erhöhtes CO_2 (A5)

Um zu beobachten, wie verschiedene Stomataeigenschaften die iWNE unter verschiedenen CO_2 -Konzentrationen beeinflussen, wurden Gaswechsellparameter mittels LI-COR 6800 in einem lokalen Mikroklima um 6 mm^2 Blattfläche vermessen. Die g_s war in allen Szenarien für RP und NILG_1 im Vergleich zu NIL_M und NIL_B geringer (Abbildung 9). NILG_1 und NIL_M lagen in der Merkmalsausprägung zwischen NIL_B und RP, besonders bei der iWNE.

Diese Zwischenstufen spiegeln die verschiedenen Kombinationen aus ABA-Gehalt und SD wider, für die diese Linien ausgewählt wurden. Es wird deutlich, dass die SD einen signifikanten Einfluss auf die Modulation der g_s hat, wobei auch der gemeinsame Einfluss beider Faktoren auf die Gasaustauschmerkmale erkennbar ist. Unabhängig von der CO_2 -Konzentration waren RP und NILG_1 wassereffizienter als NIL_M und NIL_B, was den Vorteil dieser NILs auch bei schwankenden CO_2 -Konzentrationen zeigt. Alle NILs assimilierten die gleiche Menge an CO_2 bei 400 ppm und 800 ppm, während bei 100 ppm die Assimilation für alle reduziert war (Daten nicht gezeigt). Die definierten Stomataeigenschaften des genetischen Materials erlaubten hier ein breiteres Spektrum an Stressantworten zu verfolgen und verdeutlichten den signifikanten Einfluss beider Einzelfaktoren.

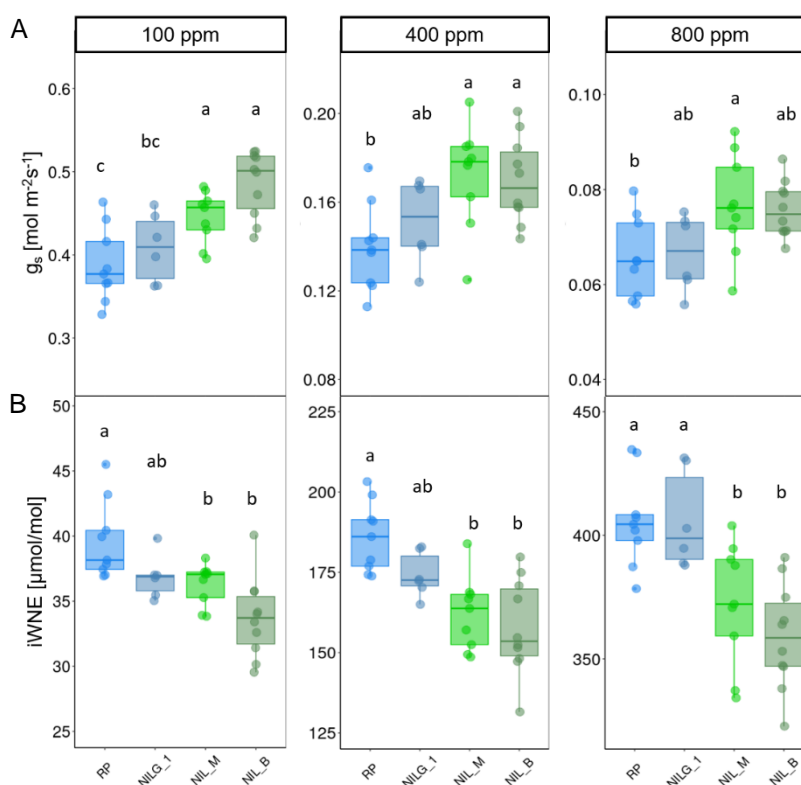


Abbildung 9: g_s (A) und iWNE (B) bei unterschiedlichen CO_2 -Konzentrationen. Die NILs wurden mit 100, 400 oder 800 ppm CO_2 in einem isolierten Mikroklima (6 mm² Blattfläche) eines LICOR-6800 behandelt. Der Vergleich zwischen den Genotypen wurde anhand einer Varianzanalyse durchgeführt, gefolgt von einem LSD-Post-Hoc-Test ($p < 0,05$). Der Stichprobenumfang beträgt $n=10$ und signifikante Unterschiede sind mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichnet.

4.1.6 Allelische Diversität des Gens ZmAbh4 (A6)

Die acht Dent-Inzuchtlinien (B106, B107, FC1890, F888, Lo1056, Lo1270, Lo1290 und PHG83) wurden aufgrund ihrer unterschiedlichen Resistenz gegenüber Trockenstress ausgewählt [28]. Die g_s ist ein wesentlicher Bestimmungsfaktor für die Wassereinsparung bei Pflanzen und hängt von den ABA-Mengen im Blatt ab. Das Protein ABH4, das die erste Stufe des ABA-Katabolismus einleitet, spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation der g_s in den NILs (voriges Kapitel). Seine allelische Variation wurde in den acht Inzuchtlinien auf Basis zuvor erfasster Sequenzierungsdaten analysiert. In keiner Linie wurde die in RP

beobachtete 200-kb-Insertion für die Region mit dem entsprechenden Allel *ZmAhb4* gefunden. Die Allele weisen jedoch kleine Insertionen und Deletionen auf, deren Einfluss auf die ABH4-Funktion weiter untersucht werden muss.

Wir konzentrierten uns daher darauf, die Stomataeigenschaften der 8 Inzuchtlinien zu charakterisieren. Die Charakterisierung der Stomatadichte und -fläche wurde mit den acht Inzuchtlinien zunächst am 3. Blatt unter Kontrollbedingungen durchgeführt (Abbildung 10). Es zeigte sich hierbei eine Korrelation von Dichte und Größe. Linien mit reduzierter Stomatagröße haben eine hohe SD (Lo1270, B107, Lo1290, PHG83) und Linien mit erhöhter Stomatagröße zeigen eine niedrige SD (B106, F888, Lo1056, FC1890). Die gleiche Korrelation wurde zuvor bei Akzessionen von *Arabidopsis thaliana* beobachtet, die in ganz Europa gesammelt wurden [27]. In derselben Studie wurde auch eine Korrelation zwischen der Größe der Stomata von *A. thaliana* und der WNE nachgewiesen, wobei Pflanzen mit kleineren Stomata eine höhere WNE aufwiesen. Maispflanzen regulieren ihre SD unter Stressbedingungen, was zu erhöhter SD und kleineren Stomata führt, wenn diese einem verringerten SWC ausgesetzt sind [25]. Daher können kleinere Stomata ein Hinweis auf eine höhere WNE sein, allerdings spielen viele andere Faktoren eine Rolle in diesem Prozess.

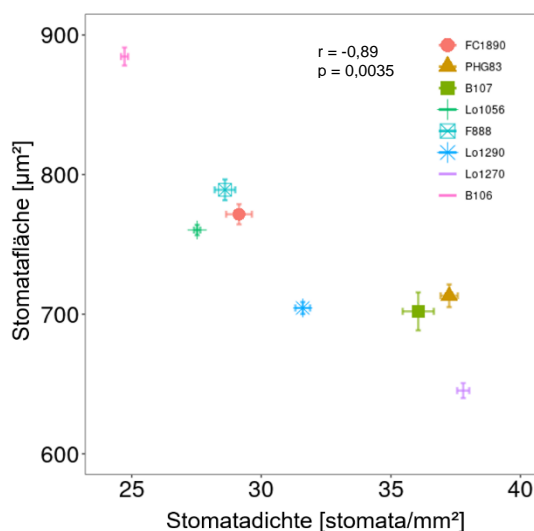


Abbildung 10: Korrelation von Stomatafläche und SD in Dent-Inzuchtlinien. Die Korrelation zwischen Stomatadichte und -fläche liegt bei $r=-0,89$ mit einer statistischen Signifikanz von $p=0,0035$ (Pearson-Korrelation). Vermessen wurde das 3. Blatt mit einem Stichprobenumfang von $n=20$.

Um die Korrelation zwischen der WNE und Stomataeigenschaften zu ermitteln, wurden $iWNE$, g_s , CO_2 -Assimilation und SD am 3. Blatt unter Kontrollbedingungen gemessen. Lo1056 und B106 zeigten im Vergleich zu den anderen Linien eine reduzierte g_s (Abbildung 11A) jedoch war die $iWNE$ vergleichbar mit anderen Genotypen (Abbildung 11B). Die übrigen Linien wiesen untereinander eine ähnliche g_s (Abbildung 11A) und CO_2 -Assimilation (Abbildung 11C) auf. FC1890, Lo1056 und B106 zeigten im Vergleich zu den übrigen Linien eine geringere Dichte (Abbildung 11D), jedoch wurde kein Zusammenhang mit der $iWNE$ festgestellt. Die Korrelation zwischen der SD in Entwicklungsstadium V3 und V5 beträgt 0,88 mit einem p-Wert von 0,0072 (Daten nicht gezeigt). Trotz einer deutlichen Abweichung bei F888, welche in V5 eine vergleichsweise höhere SD aufwies als in V3, behielten die verbleibenden

Linien in beiden Stadien proportional ähnliche SD bei. Diese Ergebnisse zeigten, dass SD und Stomatafläche in den acht Dent-Inzuchtlinien korrelieren, und dass die Stomataeigenschaften unter Kontrollbedingungen jedoch keine direkten Rückschlüsse auf Trockenstresstoleranz liefern können.

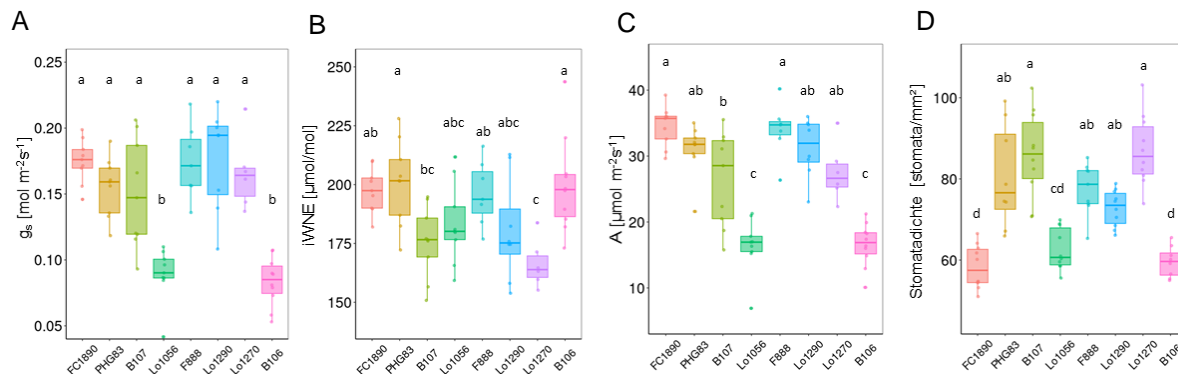


Abbildung 11: Stomata und Gaswechseleigenschaften der acht Dent-Inzuchtlinien. g_s (A), iWNE (B), CO_2 -Assimilation (C) und SD (D) wurden am 3. Blatt gemessen. Die Stichprobengröße entspricht $n=10$. Es wurde eine Varianzanalyse gefolgt von LSD Post-Hoc-Test durchgeführt ($p < 0,05$) und signifikante Unterschiede sind mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichnet.

4.2 Gewächshausexperimente (AP2)

Die Etablierung der individuellen und kombinierten Stressbedingungen mit anschließender Charakterisierung der NILs und Dent-Inzuchtlinien in Klimakammern sollte erste Ergebnisse liefern und die effiziente Durchführung von Experimenten mit passenden Bedingungen über einen längeren Entwicklungszeitraum im Gewächshaus ermöglichen. Trotz der ausführlichen Vorarbeiten war es im Gewächshaus nicht möglich, passende und stabile Bedingungen für Hitze- (A7) und Kältstress (A8) einzuführen. Da im Gewächshaus die Vermeidung von Hitzestress im Sommer nicht möglich war, war eine Kontrollbehandlung nicht realisierbar und somit konnten Infektionsexperimente im Gewächshaus (A9) nicht umgesetzt werden.

4.3 Feldexperimente (AP3)

4.3.1 Feldexperimente Trockenstress (A10)

Die Dent-Inzuchtlinien und weitere NILs wurden von 2021 bis 2023 unter gut bewässerten und wasserlimitierten Bedingungen (Regenschutzdach) auf einem Feld in Freising analysiert. Eine automatisierte Vorrichtung reduzierte den Regeneinfall mittels Überdachung der Fläche. Dies wurde ausgehend von V9 bis zur Ernte genutzt, um die Auswirkungen des Wasserentzugs während der reproduktiven Phase der Maisentwicklung zu untersuchen. Der Wassergehalt im Boden wurde dabei für einen milden Trockenstress mit durchschnittlich 10 l/m^2 pro Woche angepasst. Für jede Eigenschaft wurden die Daten mit einem linearen Modell analysiert, das den Effekt der Behandlung, des Genotyps und der Interaktion zwischen Behandlung und Genotyp berücksichtigte. Die Ertragsbewertung erfolgte mit Testkreuzungen, die

2023 in Murony (Ungarn), Székkutas (Ungarn), Caracal (Rumänien) und Giurgiu (Rumänien) unter Kontroll- und Trockenstressbedingungen angebaut wurden.

4.3.1.1 Nahezu isogene Linien

Wie im Kapitel 4.1 diskutiert, ist eine geringere g_s in wasserlimitierten Szenarien vorteilhaft, wie wir es unter kontrollierten Bedingungen in Klimakammerexperimenten beobachten konnten. Jedoch ist über die Auswirkungen verschiedener Stomataeigenschaften im Feld wenig bekannt. Um spezifische Merkmale im Zusammenhang mit der WNE zu erfassen, haben wir dazu Blattrollen und Kohlenstoffisotopen-Diskriminierung im Korn ($\Delta^{13}C_{\text{Korn}}$) bewertet (Abbildung 12).

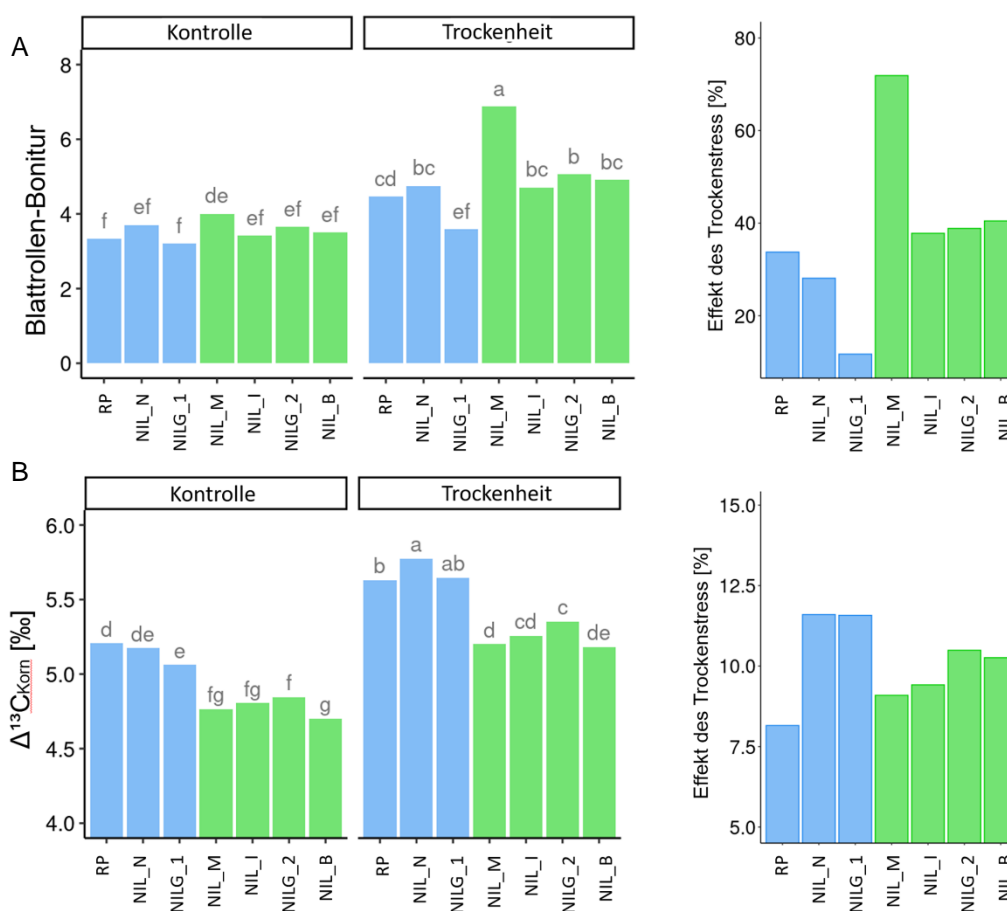


Abbildung 12: Blattrollen-Bonitur (A) und Kohlenstoffisotopen-Diskriminierung im Korn ($\Delta^{13}C_{\text{Korn}}$, B) von gut bewässerten und trockengestressten NILs im Feld. Jeweils links dargestellt sind die absoluten Werte mit der prozentualen Veränderung zwischen Kontrolle und Trockenbedingungen auf der rechten Seite. Blaue Balken stellen NILs mit einem nicht funktionsfähigen Allel des *Zmabh4*-Gens dar und grüne Balken zeigen NILs mit einem funktionsfähigen Allel. Dargestellt sind die adjustierten Mittelwerte erhoben aus Feldexperimenten über zwei ($\Delta^{13}C_{\text{Korn}}$) und drei (Blattrollen) Jahre. Der Vergleich zwischen den Genotypen wurde mit einem LSD-Post-Hoc-Test durchgeführt ($p < 0,05$). Signifikante Unterschiede zwischen den Genotypen sind mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichnet.

Während der Trockenperioden nimmt das Blattrollen als Reaktion auf die Verringerung des Wassergehalts in der Pflanze zu und dient dazu, einen umfangreichen Wasserverlust durch Transpiration zu verhindern [29]. Die NILs zeigten unter Kontrollbedingungen erwartungsgemäß ähnliche Werte für das Blattrollen. Trockenstress erhöhte das Rollen in allen Genotypen signifikant mit Ausnahme von NILG_1 ([Abbildung 12A](#)). NILG_1 weist eine niedrige g_s wie RP auf und eine hohe SD wie NIL_B. Interessanterweise hat NIL_M mit der höchsten Bewertung für Blattrollen gegensätzliche Stomataeigenschaften. Dies zeigt erneut, dass die Kombination von SD und g_s entscheidend für die WNE sein könnten.

Neben agronomischen Merkmalen wurde die $\Delta^{13}C_{Korn}$ bei diesen Linien gemessen. $\Delta^{13}C_{Korn}$ kann als Indikator für die iWNE dienen [3]. RP, NIL_N und NILG_1 zeigten im Vergleich zu NIL_M, NIL_I, NIL_G_2 und NIL_B eine erhöhte $\Delta^{13}C_{Korn}$ ([Abbildung 12B](#)), was bestätigt, dass das nicht-funktionale *ZmAbh4*-Gen und damit ein erhöhter ABA-Gehalt die $\Delta^{13}C_{Korn}$ auch unter Feldbedingungen erhöht. Unter wasserlimitierten Bedingungen waren die Unterschiede für $\Delta^{13}C_{Korn}$ ausgeprägter und Pflanzen mit geringerer g_s hatten einen Vorteil, der auf eine verbesserte WNE zurückgeführt werden kann. NIL_N und NILG_1 erhöhten ihre $\Delta^{13}C_{Korn}$ am stärksten und deutlich abgegrenzt von RP bei Trockenheit. Damit konnte gezeigt werden, dass auch die SD eine bedeutende Rolle bei der Kontrolle der $\Delta^{13}C_{Korn}$ hat.

Weitere agronomische und physiologische Merkmale wurden gemessen, um die Leistung der NILs unter wasserlimitierten Bedingungen im Feld zu vergleichen, und die Auswirkung des Trockenstresses zu beobachten ([Abbildung 13](#)). Die NILs zeigten geringe Variation in phänotypischen Merkmalen, wie es für Linien zu erwarten ist, die mehr als 95% ihres genomischen Hintergrunds teilen. Es wurde weder unter Bewässerung noch bei Trockenheit Variation in der Wuchshöhe festgestellt (Daten nicht gezeigt). Der relative Chlorophyllgehalt (SPAD) kann mit der Stressantwort in Verbindung gebracht werden und ist bei Pflanzen die unter Wassermangel leiden reduziert [30]. Die Linien NIL_M und NIL_G_2 zeigten stark verringerte SPAD-Werte (15%), während NIL_I mit 6% die geringsten Einbußen hatte. NIL_M zeigte auch eine deutliche Zunahme des Blattrollens ([Abbildung 12A](#)), was darauf hindeutet, dass die genetische Zusammensetzung für Stomataeigenschaften in NIL_M nicht optimal für den Anbau in wasserlimitierten Umwelten ist. Auffällig war, dass nur eine geringfügige Variation im Tausendkorngewicht (TKG) festgestellt wurde. Die Anzahl der Körner pro Pflanze nahm unter Trockenstress deutlich ab, wobei NIL_B 70% und NIL_G_2 50% weniger Körner produzierten. Eine eindeutige Zuordnung, welche Stomataeigenschaften unter Trockenstress vorteilhaft sind, bedarf weiterer Experimente.

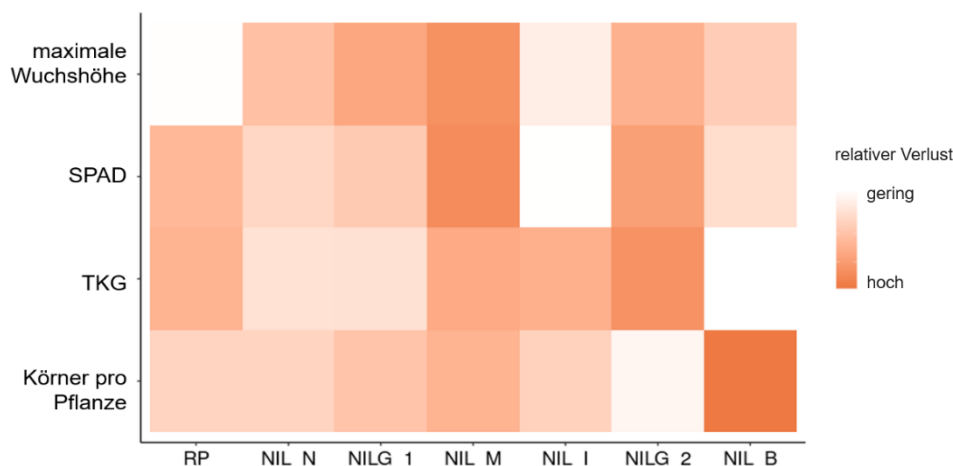


Abbildung 13: Heatmap der agronomischen Merkmale mit relativer Änderung im Vergleich von Kontrollbedingungen und Trockenbedingungen. Die Werte wurden nach Merkmal individuell normalisiert. Eine Veränderung wird als gering (weiß) bis hoch (orange) dargestellt.

Der Kornertrag und die Trockenmasse der Körner wurden bei Testkreuzungen im Jahr 2023 bewertet. Die NILs zeigten einen ähnlichen Kornertrag mit etwa 120 dt/ha unter Kontrollbedingungen und etwa 70 dt/ha unter Trockenstress (Abbildung 14A). Der Trockenmassegehalt der Körner war bei NILs mit dem nicht-funktionalen *ZmAbh4*-Gen unter Trockenheitsbedingungen erhöht (Abbildung 14B). Unter Kontrollbedingungen hatte der ABA-Spiegel nur wenig Einfluss auf den Trockenmassegehalt.

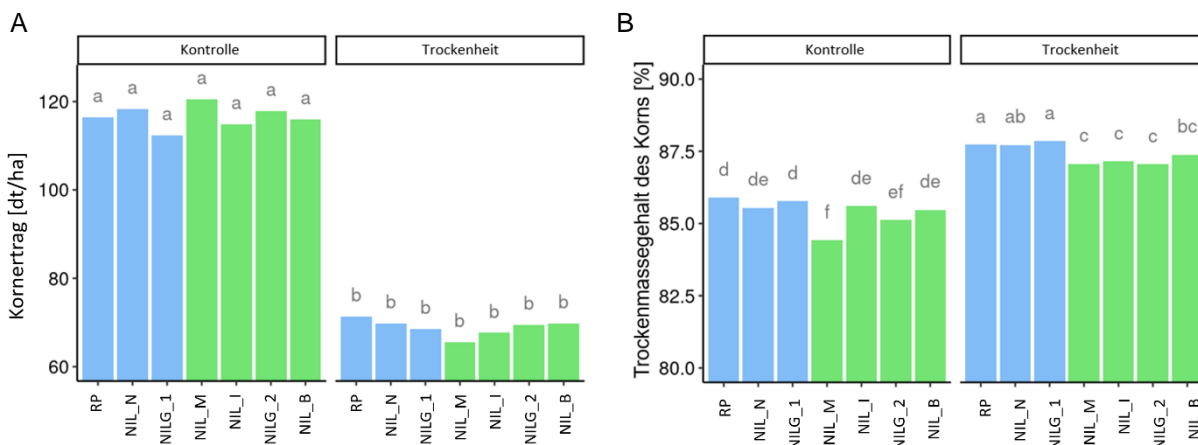


Abbildung 14: Ertrag der Testkreuzungen der nahezu isogenen Linien (NILs) unter gut bewässerten und wasserlimitierten Bedingungen. Erfasst wurden Kornertrag (A) und Trockenmassegehalt (B). Dargestellt sind adjustierte Mittelwerte des Jahres 2023. Blaue Balken stellen NILs mit dem nicht funktionsfähigen Allel des *Zmabh4*-Gens dar. Der Vergleich zwischen den Genotypen wurde anhand einer Varianzanalyse durchgeführt, gefolgt von einem LSD-Post-Hoc-Test ($p < 0,05$). Signifikante Unterschiede zwischen den Genotypen sind mit verschiedenen Buchstaben gekennzeichnet.

4.3.1.2 Dent-Inzuchtlinien

Die acht Dent-Inzuchtlinien zur Erstellung einer MAGIC-Population für Trockenresistenz wurden ebenfalls in Feldexperimenten unter gut bewässerten Bedingungen und Trockenstress (Regenschutzdach) analysiert. Hierzu wurden Blattrollen und $\Delta^{13}\text{C}_{\text{Korn}}$ gemessen (Abbildung 15). Sowohl unter Kontrollbedingungen als auch unter Trockenheit gab es signifikante Variation für Blattrollen. Es konnte keine offensichtliche Beziehung zwischen Blattrollen, SD und g_s hergestellt werden. Auch für $\Delta^{13}\text{C}_{\text{Korn}}$ konnten keine signifikanten Zusammenhänge mit Stomataeigenschaften gezeigt werden. Diese Ergebnisse stimmen mit weiteren Parametern wie TKG und der Kornanzahl pro Pflanze unter Kontroll- und Trockenstressbedingungen überein (Daten nicht gezeigt), die von einer Ertragsperspektive aus keine Rückschlüsse auf Stomataeffekte zuließen. Ein deutlicher Zusammenhang zwischen Stomataeigenschaften und agronomischen Parametern ist daher für die Dent-Inzuchtlinien unter Feldbedingungen nicht erkennbar gewesen.

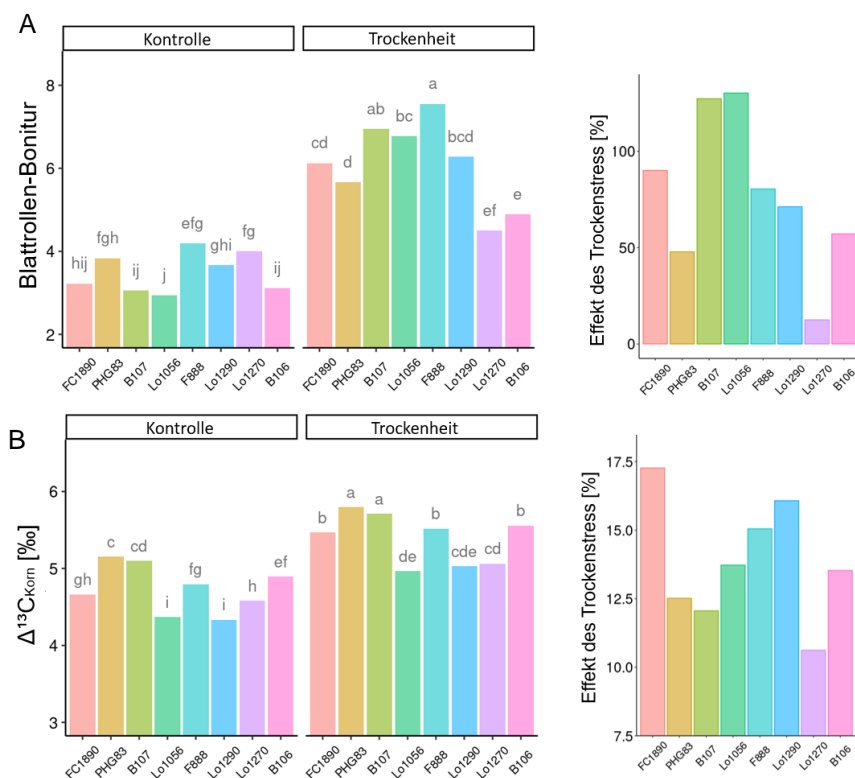


Abbildung 15: Blattrollen-Bonitur (A) und Kohlenstoffisotopen-Diskriminierung im Korn ($\Delta^{13}\text{C}_{\text{Korn}}$, B) von gut bewässerten und trockengestressten MAGIC-Linien im Feld. Jeweils links dargestellt sind die absoluten Werte mit der prozentualen Veränderung zwischen Kontrolle und Trockenbedingungen auf der rechten Seite. Dargestellt sind die adjustierten Mittelwerte aus von zwei ($\Delta^{13}\text{C}_{\text{Korn}}$) oder drei (Blattrollen) Jahren. Der Vergleich zwischen den Genotypen wurde anhand einer Varianzanalyse durchgeführt, gefolgt von einem LSD-Post-Hoc-Test ($p < 0,05$). Signifikante Unterschiede zwischen den Genotypen sind mit verschiedenen Buchstaben gekennzeichnet.

4.3.2 Feldexperimente Trockenstress+ Hitze (A11)

Im Sommer 2021, 2022 und 2023 wurden die acht Dent-Inzuchtlinien zusammen mit der MAGIC-Population und den NILs auf agronomische Merkmale in Feldversuchen charakterisiert. Die Feldversuche fanden an verschiedenen Standorten statt und sind in [Tabelle 1](#) beschrieben. In Zusammenarbeit mit dem MAZE-Projekt (<https://www.europeanmaize.net>) und KWS wurden phänotypische Daten erhoben. Viele Faktoren tragen zum Hitze- und Trockenstress bei Mais bei, und es ist von großer Bedeutung, jede Umwelt bezüglich ihrer spezifischen Wachstumsbedingungen zu klassifizieren. Die Wetterdaten zur Verifizierung von Hitze- und Trockenstress wurden analysiert und jede der Umgebungen klassifiziert (Tabelle 1).

Tabelle 1: Zusammenfassung von Hitze- und Trockenstressexperimenten im Feld.

| Jahr | Feld Standort | Abkürzung | Behandlung | Klimazusatz |
|------|-----------------|-----------|---------------------------|-------------|
| 2021 | Monselice, IT | MCE | Kontrolle und Trockenheit | Hitze |
| 2021 | Murony, HU | MUR | Kontrolle und Trockenheit | Hitze |
| 2022 | Dietersheim, DE | DTH | Trockenheit | |
| 2022 | Monselice, IT | MCE | Kontrolle und Trockenheit | Hitze |
| 2022 | Merdingen, DE | MER | Kontrolle und Trockenheit | |
| 2022 | Murony, HU | MUR | Kontrolle und Trockenheit | Hitze |
| 2022 | Roggenstein, DE | ROG | Kontrolle | |
| 2023 | Dietersheim, DE | DTH | Trockenheit | |
| 2023 | Roggenstein, DE | ROG | Kontrolle | |

4.4 Stellungnahme zum Projekterfolg und aktualisierter Zeitplan

Im Kontext von AP1 wurden A1 (Optimierung biotischer Stress), A2 (Klimakammerexperiment biotischer Stress), A4 (Klimakammerexperimente Trockenstress + Hitze) und A6 (Allelische Diversität des Gens *ZmAbh4*) bis zum Winter 2023 erfolgreich durchgeführt. A5 (Klimakammerexperimente Trockenstress + erhöhtes CO₂), obwohl teilweise abgeschlossen, wies eine Abweichung von der beabsichtigten Methodik auf, da die Pflanzen einem Mikroklima mit erhöhten CO₂-Werten ausgesetzt wurden, anstelle der vorgesehenen kompletten Pflanzenimmersion. Um die Experimente unter Kältestress (A3) und unter erhöhten CO₂-Konzentrationen (A5) durchzuführen, wurde aus Haushaltsmitteln eine neue Klimakammer angeschafft. Aufgrund technischer Probleme bei der Kammerinstallation und aufgrund einer dringend notwendigen Reparatur unserer Gasaustausch-Messgeräte verzögerten sich beide Experimente. In der neuen Kammer wurde ein Testexperiment unter kontrollierten Bedingungen

gen durchgeführt, das erfolgreich abgeschlossen werden konnte. Daher können die Experimente in A3 und A5 voraussichtlich bis Ende 2024 bzw. Anfang 2025 abgeschlossen werden. Saatgut für diese Experimente wurde im Sommer 2024 im Gewächshaus vermehrt.

AP2 (Gewächshausexperimente) wurde aufgrund der inhärenten Instabilität der Umgebungsbedingungen im Gewächshausumfeld aufgegeben.

AP3 umfasst Feldversuche, mit umfassender Datenerhebung über drei Jahre. A10 (Feldexperimente Trockenstress) wurde erfolgreich abgeschlossen. Die Datenanalyse wird derzeit durchgeführt. A11 (Feldexperimente Trockenstress + Hitze) ist abgeschlossen. Die Klassifizierung der Umgebungen ist erfolgt und die Datenanalyse wird derzeit durchgeführt.

Wie oben bereits erläutert, wurde der Projektplan aufgrund der bisher erzielten Ergebnisse angepasst. Die Änderungen sind in Abbildung 16 dargestellt.

| AP1 | Klimakammerexperimente | Jahr 1 | | Jahr 2 | | | | Jahr 3 | | | | Jahr 4 | | |
|-----|---|-----------|----|-----------|----|-----|----|-----------|----|-----|----|----------|----|-----|
| | | (6-12/21) | | (1-12/22) | | | | (1-12/23) | | | | (1-8/24) | | |
| | | III | IV | I | II | III | IV | I | II | III | IV | I | II | III |
| A1 | Optimierung biotischer Stress | | | | ✓ | | | | | | | | | |
| A2 | Klimakammerexperiment biotischer Stress | | | | | | ✓ | | | | | | | |
| A3 | Klimakammerexperimente Trockenstress + Kälte | | | | | | | | | | | | | |
| A4 | Klimakammerexperimente Trockenstress + Hitze | | | | | | | | | | | | | |
| A5 | Klimakammerexperimente Trockenstress + erhöhtes CO2 | | | | | | | | | | | | | |
| A6 | Allelische Diversität des Gens <i>ZmAbh4</i> | | ✓ | | | | | | | | | | | |
| Z1 | Verständnis der Funktion von Stomata bei Stressreaktionen in verschiedenen genomischen Hintergründen | | | | | | | | | | | | | x |
| Z2 | Verständnis über die allelische Diversität des Gens <i>ZmAbh4</i> und seine Funktion in der Stressantwort | | | | | | | | | | | | | x |
| AP2 | Gewächshausexperimente | Jahr 1 | | Jahr 2 | | | | Jahr 3 | | | | Jahr 4 | | |
| A7 | Gewächshausexperiment Trockenstress + Hitze | | | | | | | | | | | | | |
| A8 | Gewächshausexperiment Trockenstress + Kälte | | | | | | | | | | | | | |
| A9 | Gewächshausexperiment biotischer Stress | | | | | | | | | | | | | |
| Z3 | Verständnis der Funktion von Stomata für die Stressantwort im späteren Entwicklungsstadium | | | | | | | | | | | | | x |
| AP3 | Feldexperimente | Jahr 1 | | Jahr 2 | | | | Jahr 3 | | | | Jahr 4 | | |
| A10 | Feldexperimente Trockenstress | ✓ | | | | ✓ | | | | ✓ | | | | |
| A11 | Feldexperimente Trockenstress+ Hitze | ✓ | | | | ✓ | | | | ✓ | | | | |
| Z4 | Bewertung des Züchtungspotenzials | | | | | | | | | | | | | x |

Verschobene Ziele
 Anpassungen 2022 und 2023
 Anpassungen 2024

Abbildung 16: Aktualisiertes Gantt-Diagramm. Die ursprüngliche Planung ist in grau dargestellt und Anpassungen im Verlauf des Projekts sind orange bzw. grün unterlegt.

4.5 Nutzen und Verwertbarkeit der Projektergebnisse sowie Einordnung in die Bayerische Klima-Anpassungsstrategie

Der Klimawandel erfordert geeignete Anpassungsstrategien, um eine nachhaltige und ressourcenschonende landwirtschaftliche Produktion zu sichern. Im Bereich der Pflanzenproduktion sind dabei vor allem verschiedene abiotische Stressfaktoren relevant, denen durch angepasste Produktionstechnik sowie Anbau und Züchtung stresstoleranter Kulturarten begegnet werden kann. Mit der Kombination aus veränderten Niederschlagsverteilungen mit teilweise länger anhaltenden Trockenheitsphasen im Sommer sowie steigenden Temperaturen ergeben sich für viele Kulturarten neue Herausforderungen. Insbesondere während der Blüte reagieren Kulturarten wie Getreide und Mais sehr empfindlich auf Trockenstress.

Mit einer Anbaufläche von mehr als 500.000 ha und den vielfältigen Verwendungsmöglichkeiten ist Mais eine der wichtigsten Nutzpflanzen in Bayern. Seine Produktivität geht jedoch mit einem hohen Wasserverbrauch einher. Die genetische Verbesserung der WNE und Stresstoleranz von Mais ist eine Maßnahme, um eine der wichtigsten Nutzpflanzen in Bayern an die Auswirkungen des Klimawandels anzupassen und steht somit in direktem Bezug zu den Maßnahmen, die als Teil der Bayerischen Klimaanpassungsstrategie (BayKLAS) vorgeschlagen wurden [31]. Sie stellt zudem einen aktiven Beitrag zur Einsparung von Wasser dar, da Maispflanzen mit verbesserter WNE dieselbe Menge an atmosphärischem CO₂ mit einem geringeren Wasserverbrauch fixieren. Es werden jedoch nur wassernutzungseffiziente Maissorten in der Lage, sein zur Ertragssicherung beizutragen, die zugleich tolerant gegenüber verschiedenen unkontrollierbaren Stressfaktoren sind, die parallel auftreten.

Das Projekt wurde konzipiert, um die effizientere Wassernutzung von Pflanzen in die Anwendung zu bringen. Die Strategie basierte auf Vorkenntnissen zur Rolle von ABA und Stomataleitfähigkeit für die WNE und auf definiertem genetischem Material, das in Vorarbeiten am Lehrstuhl entwickelt wurde. Die Charakterisierung von Stomataeigenschaften unter verschiedenen Stressbedingungen und deren Kombinationen zeigte deutlich den hohen Stellenwert der Stomataleitfähigkeit, die hier besonders über ABA vermittelt wurde. Die Regulierung der Stomatadichte konnte ebenfalls als zentraler Faktor für die Stresstoleranz identifiziert werden. Sollte sich bestätigen, dass die verringerte Stomataleitfähigkeit zudem, wie vermutet, zu einer erhöhten Resistenz gegenüber Pathogenen führt, kann sowohl die WNE als auch die durch den Klimawandel zu erwartende Besiedelung des Mais mit neuen Pathogenen besser kontrolliert werden. Somit können die hier erarbeiteten Forschungsergebnisse dazu beitragen, die nachhaltige Produktion von Futter- und Nahrungsmitteln sowie von erneuerbaren Rohstoffen in Bayern zu sichern.

Die Kooperation mit einem Wirtschaftspartner gewährleistet die schnelle Umsetzung der gewonnenen Erkenntnisse in die Praxis in Form verbesserter, klimaangepasster Sorten. Die Erkenntnisse über molekulare Mechanismen der Stressresistenz und die zugrunde liegenden Gene fließen über die Nutzung Marker-gestützter Verfahren in Züchtungsstrategien ein. Dabei bilden wassernutzungseffiziente und stresstolerante Maislinien eine wichtige Grundlage für die Entwicklung neuer Sorten.

5 Veröffentlichungen

Vorträge:

- Trockentoleranz durch bessere Wassernutzung, online, 08.07.2021
- Schön, C.-C., Avramova, V., Debastiani Benato, B. (2024): Trockentoleranz durch bessere Wassernutzung. Abschlussveranstaltung PV BayKlimaFit 2, 01.07.2024

Publikationen:

- Barl, L., Debastiani Benato, B., Genze, N., Grimm, D.G, Gigl, M., Dawid, C., Schön, C.-C., Avramova, V. Stomatal properties enhance each other in their effect on water use efficiency in maize, im Peer-Review-Verfahren, Scientific Reports

Poster-Präsentation auf wissenschaftlichen Konferenzen:

- Trockentoleranz durch bessere Wassernutzung, online, 08.07.2021
- Salt and Water Stress in Plants, Les Diablerets, Schweiz: "The effect of stomatal conductance on drought and heat stress responses in maize", 22. - 27.05.2022.
- SFB924 Student Retreat 2022, Gunzenhausen, Deutschland: "Impact of different stomatal properties on biotic and abiotic stresses in maize", 10. - 12.10.2022.
- 65th Maize Genetics, St. Louis, Vereinigte Staaten: "Unravelling the relationship between stomatal properties and *Cercospora zea-maydis* infection in maize", 16. - 19.03.2023.
- Plant Biology of the Next Generation, Freising, Deutschland: "Stomata role in *Cercospora zea-maydis* infection in maize", 12. - 14.04.2023.
- Translational Research in Crops, Ghent, Belgium: "Additive effect of stomatal conductance and density on maize resistance to drought", 22. - 23.06.2023.
- Abschlussveranstaltung PV BayKlimaFit 2, München, Deutschland: „Trockentoleranz durch bessere Wassernutzung“, 01.07.2024

Sonstige Präsentationen:

- Beitrag für die BR-Fernsehsendung "Unser Land": "Gegen den Trockenstress - Wie züchtet man klimaresistenten Mais", 16.09.2022
- Trockentoleranz durch bessere Wassernutzung, online, 08.07.2021

6 Vernetzungen

Eine Zusammenarbeit mit Prof. Patrick Bienert (Teilprojekt 8), Prof. Thomas Dresselhaus (Teilprojekt 2) und Prof. Caroline Gutjahr (Teilprojekt 9) wurde durch die gemeinsame Nutzung der acht Dent-Inzuchtlinien gestärkt. Genomsequenzierungsdaten derselben Genotypen wurden Prof. Caroline Gutjahr zur Verfügung gestellt. Dr. Karina van der Linde (Teilprojekt 7) von der Universität Regensburg und Prof. Ralph Hückelhoven vom Lehrstuhl für Phytopathologie (TUM, Teilprojekt 6) unterstützten bei der Etablierung des biotischen Stresses.

7 Geplante oder bestehende Industriebeteiligung

Die Feldversuche mit den Linien per se und Testkreuzungen der acht Dent-Inzuchtlinien und NILs wurden in Zusammenarbeit mit dem Pflanzenzüchtungsunternehmen KWS SAAT SE & Co. KGaA durchgeführt. Unterstützung von KWS wurde auch während der Etablierung von biotischem Stress und durch die Bereitstellung von Saatgut der acht Dent-Inzuchtlinien geleistet.

8 Zusammenfassung

Mais ist eine der weltweit am häufigsten angebauten Getreidearten und nimmt auch in Bayern eine bedeutende Fläche ein. Im Jahr 2023 wurde Mais auf 526.000 Hektar in Bayern angebaut. Das entspricht einem Anteil von 25,9% an der gesamten Ackerfläche. Die Landwirtschaft wird jedoch zunehmend durch den Klimawandel beeinflusst, insbesondere durch schwankende Temperaturen und unregelmäßige Niederschläge, und beeinträchtigt dadurch das Wachstum und den Ertrag. In vielen Regionen werden extreme Temperaturen und Wasserknappheit erwartet, was auch die Ausbreitung von Krankheiten begünstigen kann. Der prognostizierte Anstieg des CO₂-Gehalts könnte einige negative Auswirkungen mildern, jedoch beeinflussen diese klimatischen Veränderungen auch die Spaltöffnungen (Stomata) in den Blättern, die eine wichtige Rolle bei verschiedenen pflanzlichen Prozessen spielen.

Um die Wassernutzungseffizienz (WNE) bei Mais besser zu verstehen, wurden „nahezu-isogene Linien“ (NILs) entwickelt, die sich in ihren Stomataeigenschaften unterscheiden. NIL_B trägt eine Introgression, die zu einer erhöhten Stomatadichte (SD), Stomataleitfähigkeit (g_s) und einer niedrigeren WNE im Vergleich zu seinem rekurrenten Elternteil (RP) führt. Durch die Rückkreuzung von NIL_B zu RP wurden NILs mit unterschiedlichen Stomataeigenschaften erzeugt, die es ermöglichen, den Einfluss dieser Eigenschaften auf die Stressresistenz von Mais zu untersuchen. Darüber hinaus wurde ein Diversitätspanel aus acht Inzuchtlinien untersucht, das Unterschiede in Hitze- und Trockentoleranz sowie Stomataleitfähigkeit und Stomatadichte aufweist.

Es wurden Experimente konzipiert, mit denen die Antwort definierter Genotypen auf diverse Stressfaktoren, darunter Pathogeninfektion, Trockenheit, Hitze und erhöhtes CO₂, untersucht wurde. Graufleckigkeit (GLS) wurde in NILs analysiert, wobei höhere g_s und SD von NIL_B mit höheren Infektionsraten korrelierten. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass RP nur während der anfänglichen Infektion Vorteile hat. Während niedrigere g_s und SD das Eindringen des Pilzes verzögerten, könnten die höheren ABA-Spiegel von RP den Fortschritt der Infektion nach dem Eindringen ins Blatt gefördert haben. Ergebnisse aus Trockenstressexperimenten zeigten, dass eine niedrigere g_s , verursacht durch das nicht-funktionale *Zmabh4*-Allel und infolge dessen erhöhten ABA-Gehalt, der Hauptfaktor für eine erhöhte WNE in Labor- sowie Feldversuchen war. Der Einfluss von Hitzestress und Trockenstress auf die Gesamtleistung während des vegetativen Wachstums wurde ebenfalls untersucht und bestätigt die potenziellen Vorteile von RP bei länger anhaltenden Stressperioden. Für die Analysen der Gaswechseleigenschaften wurden Blätter in einem Mikroklima mit unterschiedlichen CO₂-Konzentrationen behandelt und vermessen. Die Ergebnisse unterstreichen den Einfluss des *ZmAbh4*-Gens auf die g_s und iWNE. Genotypen mit niedriger g_s zeigten durchgängig eine höhere Wassernutzungseffizienz.

Die Allele des *ZmAbh4*-Gens in den acht Dent-Inzuchtlinien zeigten nur geringe Sequenzvariation. Jedoch konnte eine negative Korrelation zwischen Stomatagröße und SD während der vegetativen Phase gezeigt werden. Messungen in Klimakammern zeigten Variation in der WNE, g_s , CO₂-Assimilation und SD zwischen den Linien. Das Projekt umfasste drei Jahre Feldversuche mit acht Inzuchtlinien und NILs mit unterschiedlichen Bewässerungsbe-

dingungen. Dabei wurden verschiedene Merkmale wie Blattrollen, Kohlenstoffisotopen-Diskriminierung im Korn ($\Delta^{13}\text{C}_{\text{Korn}}$) und agronomische Eigenschaften analysiert. Besonders bei den NILs ist eine niedrigere g_s mit verbesserter WNE verbunden, was zu besserer Leistung unter wasserlimitierten Bedingungen führte. Es wurde kein direkter Effekt unterschiedlicher SD auf agronomische Merkmale festgestellt. Die Analyse der acht Inzuchtlinien ergab Variation in Blattrollen, WNE und Ertrageigenschaften. Obwohl Trockenstresseffekte physiologisch beobachtet wurden, waren eindeutige Korrelationen zwischen der anfänglichen Klassifizierung zur Trockentoleranz und agronomischen Merkmalen nicht möglich. Dies betont die vielschichtige Natur der Trockentoleranz beim Mais. Kombinierte Feldversuche mit Hitze- und Trockenstress wurden durchgeführt, die Datenerhebung ist abgeschlossen und die Analyse soll demnächst noch durchgeführt werden.

Zusammenfassend trägt dieses Projekt erheblich dazu bei, das komplexe Zusammenspiel zwischen Stomataeigenschaften und Umweltstress in Mais zu verstehen. Im Rahmen des Projekts wurde untersucht, wie Stomataeigenschaften die Reaktion von Maispflanzen auf verschiedene Stressfaktoren beeinflussen, indem zwei Gruppen unterschiedlich komplexen genetischen Materials untersucht wurden. Dabei waren die wesentlichen Ergebnisse: 1) Die Etablierung experimenteller Protokolle für die Simulierung individueller und kombinierter Stressszenarien in der Klimakammer war erfolgreich. 2) Es zeigte sich, dass eine reduzierte Stomataleitfähigkeit sowohl unter Trocken- als auch unter Hitzestress vorteilhaft ist. Dies gilt auch für die Kombination aus beiden. 3) Es wurden neue Erkenntnisse zur Rolle der Stomataleitfähigkeit und -dichte unter Pathogenbefall gewonnen. Während das Eindringen des Pilzes durch höhere ABA-Spiegel verzögert wurde, förderten sie vermutlich den Fortschritt der Infektion nach dem Eindringen ins Blatt.

Die Ergebnisse sind von Bedeutung für die Entwicklung widerstandsfähiger Nutzpflanzen vor dem Hintergrund der durch den Klimawandel bedingten Herausforderungen. Die gesammelten Daten sind eine wertvolle Ressource für die Erforschung genetischer Faktoren, die zur Minderung von Trockenstress und Pathogenbefall beitragen, und bieten die Grundlage für gezielte Züchtungsstrategien.

9 Ausblick

Die Kombination aus verändertem ABA-Katabolismus und Stomataentwicklung zeigten, wie eng verzahnt diese Komponenten für die optimale Nutzung der Ressourcen Wasser und CO₂ sind. Die eindeutige Charakterisierung von physiologischen und agronomischen Merkmalen aufgrund definierter Allele, bietet eine gute Grundlage, dieses Thema auf weitere ABA-Metabolismus-Komponenten zu erweitern. Ebenso zeigten sich neue Einblicke im Umgang mit Pathogenen mit unerwarteten Ergebnissen im Zusammenspiel von Stomataeigenschaften und ABA-Gehalt. Durch die Etablierung der Infektionsbedingungen wurde die Basis für weiterführende Arbeiten geschaffen. Für das Verständnis des Einflusses der SD auf Stressantwort ist eine verfeinerte Herangehensweise nötig. Die Ergebnisse dieses Projekts legen nahe, dass vertiefte Studien zur Stomatadichte und deren Entwicklung sinnvoll sind. Im Hinblick auf genetische Vielfalt zeigte sich die Komplexität der Stomataeigenschaften in den Dent-Inzuchtlinien und die Notwendigkeit von definiertem Material für eine vertiefte genetische Analyse. Die aus den acht Dent-Inzuchtlinien entwickelte MAGIC-Population bestehend aus knapp 500 doppelt-haploiden Linien bildet eine sehr gute Grundlage dafür.

Literaturverzeichnis

- [1] P. N. Lal *et al.*, *National systems for managing the risks from climate extremes and disasters*, vol. 9781107025. 2012. doi: 10.1017/CBO9781139177245.009.
- [2] S. P. Long, E. A. Ainsworth, A. Rogers, and D. R. Ort, "Rising Atmospheric Carbon Dioxide: Plants FACE the future," *Annu. Rev. Plant Biol.*, vol. 55, pp. 591–628, 2004, doi: 10.1146/annurev.arplant.55.031903.141610.
- [3] V. Avramova *et al.*, "Carbon isotope composition, water use efficiency, and drought sensitivity are controlled by a common genomic segment in maize," *Theor. Appl. Genet.*, vol. 132, no. 1, pp. 53–63, Jan. 2019, doi: 10.1007/s00122-018-3193-4.
- [4] A. H. El-Sappah *et al.*, "Heat Stress-Mediated Constraints in Maize (*Zea mays*) Production: Challenges and Solutions," *Front. Plant Sci.*, vol. 13, p. 879366, Apr. 2022, doi: 10.3389/fpls.2022.879366.
- [5] K. Begcy, T. Nosenko, L.-Z. Zhou, L. Fragner, W. Weckwerth, and T. Dresselhaus, "Male Sterility in Maize after Transient Heat Stress during the Tetrad Stage of Pollen Development," *Plant Physiol.*, vol. 181, no. 2, pp. 683–700, Oct. 2019, doi: 10.1104/pp.19.00707.
- [6] P. Sowiński, J. Fronk, M. Jończyk, M. Grzybowski, P. Kowalec, and A. Sobkowiak, "Maize Response to Low Temperatures at the Gene Expression Level: A Critical Survey of Transcriptomic Studies," *Front. Plant Sci.*, vol. 11, no. September, pp. 1–7, 2020, doi: 10.3389/fpls.2020.576941.
- [7] K. R. Albert, T. N. Mikkelsen, A. Michelsen, H. Ro-Poulsen, and L. van der Linden, "Interactive effects of drought, elevated CO₂ and warming on photosynthetic capacity and photosystem performance in temperate heath plants," *J. Plant Physiol.*, vol. 168, no. 13, pp. 1550–1561, 2011, doi: 10.1016/j.jplph.2011.02.011.
- [8] G. Zinta *et al.*, "Physiological, biochemical, and genome-wide transcriptional analysis reveals that elevated CO₂ mitigates the impact of combined heat wave and drought stress in *Arabidopsis thaliana* at multiple organizational levels," *Glob. Change Biol.*, vol. 20, no. 12, pp. 3670–3685, Dec. 2014, doi: 10.1111/GCB.12626.
- [9] E. A. Ainsworth *et al.*, "Next generation of elevated [CO₂] experiments with crops: A critical investment for feeding the future world," *Plant Cell Environ.*, vol. 31, no. 9, pp. 1317–1324, 2008, doi: 10.1111/j.1365-3040.2008.01841.x.
- [10] O. Ghannoum, "C₄ photosynthesis and water stress," *Ann. Bot.*, vol. 103, no. 4, pp. 635–644, 2009, doi: 10.1093/aob/mcn093.
- [11] G. Q. Feng, Y. Li, and Z. M. (Max) Cheng, "Plant Molecular and Genomic Responses to Stresses in Projected Future CO₂ Environment," *Crit. Rev. Plant Sci.*, vol. 33, no. 2–3, pp. 238–249, 2014, doi: 10.1080/07352689.2014.870421.
- [12] K. M. Gillespie *et al.*, "Greater antioxidant and respiratory metabolism in field-grown soybean exposed to elevated O₃ under both ambient and elevated CO₂" *Plant Cell Environ.* vol. 35, no. 1, pp. 169–184, 2011, doi: 10.1111/j.1365-3040.2011.02427.x.
- [13] C. W. Lim, W. Baek, J. Jung, J.-H. Kim, and S. C. Lee, "Function of ABA in Stomatal Defense against Biotic and Drought Stresses," *Int J Mol Sci*, vol. 16, pp. 15251–15270, 2015, doi: 10.3390/ijms160715251.
- [14] V. Ramegowda and M. Senthil-Kumar, "The interactive effects of simultaneous biotic and abiotic stresses on plants: Mechanistic understanding from drought and pathogen combination," *J. Plant Physiol.*, vol. 176, pp. 47–54, 2015, doi: 10.1016/j.jplph.2014.11.008.
- [15] P. M. Beckman, "External Growth, Penetration, and Development of *Cercospora zeae-maydis* in Corn Leaves," *Phytopathology*, vol. 72, no. 7. p. 810, 1982. doi: 10.1094/phyto-77-810.
- [16] P. W. Crous, J. Z. Groenewald, M. Groenewald, P. Caldwell, U. Braun, and T. C. Harrington, "Species of *Cercospora* associated with grey leaf spot of maize," *Stud. Mycol.*, vol. 55, pp. 189–197, 2006, doi: 10.3114/sim.55.1.189.
- [17] S. Blankenagel *et al.*, "Natural alleles of the abscisic acid catabolism gene *ZmAbh4* modulate water use efficiency and carbon isotope discrimination in maize," *Plant Cell*, vol. 34, no. 10, pp. 3860–3872, Sep. 2022, doi: 10.1093/plcell/koac200.

- [18] S. A. Prado *et al.*, “Phenomics allows identification of genomic regions affecting maize stomatal conductance with conditional effects of water deficit and evaporative demand.” WILEY Plant cell and environment, pp. 314–326, 2017. doi: 10.1111/pce.13083.
- [19] H. Kim, J. B. Ridenour, L. D. Dunkle, and B. H. Bluhm, “Regulation of Stomatal Tropism and Infection by Light in *Cercospora zeae-maydis*: Evidence for Coordinated Host/Pathogen Responses to Photoperiod?,” *PLoS Pathog.*, vol. 7, no. 7, p. e1002113, Jul. 2011, doi: 10.1371/journal.ppat.1002113.
- [20] “Linkage of Molecular Markers to *Cercospora zeae-maydis* Resistance in Maize.pdf.”
- [21] J. Korsman, B. Meisel, F. J. Kloppers, B. G. Crampton, and D. K. Berger, “Quantitative phenotyping of grey leaf spot disease in maize using real-time PCR,” *Eur. J. Plant Pathol.*, vol. 133, no. 2, pp. 461–471, Jun. 2012, doi: 10.1007/s10658-011-9920-1.
- [22] B. Asselbergh *et al.*, “Resistance to *Botrytis cinerea* in *s. itiens*, an Abscisic Acid-Deficient Tomato Mutant, Involves Timely Production of Hydrogen Peroxide and Cell Wall Modifications in the Epidermis,” *Plant Physiol.*, vol. 144, no. 4, pp. 1863–1877, Aug. 2007, doi: 10.1104/pp.107.099226.
- [23] A. Sánchez-Vallet *et al.*, “Disruption of Abscisic Acid Signaling Constitutively Activates Arabidopsis Resistance to the Necrotrophic Fungus *Plectosphaerella cucumerina*,” *Plant Physiol.*, vol. 160, no. 4, pp. 2109–2124, Dec. 2012, doi: 10.1104/pp.112.200154.
- [24] K. Schmidt, M. Pflugmacher, S. Klages, A. Mäser, A. Mock, and D. J. Stahl, “Accumulation of the hormone abscisic acid (ABA) at the infection site of the fungus *Cercospora beticola* supports the role of ABA as a repressor of plant defence in sugar beet,” *Mol. Plant Pathol.*, vol. 9, no. 5, pp. 661–673, Sep. 2008, doi: 10.1111/j.1364-3703.2008.00491.x.
- [25] W. Zhao, Y. Sun, R. Kjelgren, and X. Liu, “Response of stomatal density and bound gas exchange in leaves of maize to soil water deficit,” *Acta Physiol. Plant.*, vol. 37, no. 1, p. 1704, Jan. 2015, doi: 10.1007/s11738-014-1704-8.
- [26] L. Serna, “Maize stomatal responses against the climate change,” *Front. Plant Sci.*, vol. 13, p. 952146, Sep. 2022, doi: 10.3389/fpls.2022.952146.
- [27] “Natural variation in stomata size contributes to the local adaptation of water-use efficiency in *Arabidopsis thaliana*.”
- [28] E. Millet *et al.*, “Genome-wide analysis of yield in Europe: allelic effects as functions of drought and heat scenarios,” *Plant Physiol.*, p. pp.00621.2016, Jul. 2016, doi: 10.1104/pp.16.00621.
- [29] A. Kadioglu and R. Terzi, “A Dehydration Avoidance Mechanism: Leaf Rolling,” *Bot. Rev.*, vol. 73, no. 4, pp. 290–302, Oct. 2007, doi: 10.1663/0006-8101(2007)73[290:ADAMLR]2.0.CO;2.
- [30] L. M., “Response of photosynthesis and chlorophyll fluorescence to drought stress in two maize cultivars,” *Afr. J. Agric. RESEARCH*, vol. 7, no. 34, Sep. 2012, doi: 10.5897/AJAR12.082.
- [31] Bayerisches Staatsministerium für Umwelt und Verbraucherschutz (2017), Bayerische Klima-Anpassungsstrategie (2016), [https://www.bestellen.bayern.de/application/e-shop_app000006?SID=525371815&ACTIONxSESSx-SHOWPIC\(BILDxKEY:%27stmuv_klima_009%27,BILDxCLASS:%27Artikel%27,BILDxTYPE:%27PDF%27\)](https://www.bestellen.bayern.de/application/e-shop_app000006?SID=525371815&ACTIONxSESSx-SHOWPIC(BILDxKEY:%27stmuv_klima_009%27,BILDxCLASS:%27Artikel%27,BILDxTYPE:%27PDF%27))

Abbildungsverzeichnis

| | |
|---|----|
| Abbildung 1: Genetische Konstitution der NILs | 7 |
| Abbildung 2: Stomataeigenschaften von NILs, B73 und Mo18W..... | 10 |
| Abbildung 3: Infektionsraten von NILs, B73 und Mo18W..... | 11 |
| Abbildung 4: Krankheitsverlauf mit Boniturskala für Chlorose (A), Nekrose (B), und GLS (C), sowie Pilz-DNA Menge (D). | 12 |
| Abbildung 5: Abnahme des Bodenwassergehalts (SWC) in bei Trockenstress..... | 14 |
| Abbildung 6: Blattwachstumsrate unter Kontrollbedingungen und unter Trockenstress..... | 15 |
| Abbildung 7: Stomatamodulation unter Trockenstress..... | 16 |
| Abbildung 8: Stomataleitfähigkeit (g_s , A), iWNE (B), Fv/Fm (C) und SPAD (D) aus Messungen mit Einzelstress und kombiniertem Hitze- und Trockenstress. | 17 |
| Abbildung 9: g_s (A) und iWNE (B) bei unterschiedlichen CO ₂ -Konzentrationen..... | 18 |
| Abbildung 10: Korrelation von Stomatafläche und SD in Dent-Inzuchtlinien..... | 19 |
| Abbildung 11: Stomata und Gaswechseleigenschaften der acht Dent-Inzuchtlinien..... | 20 |
| Abbildung 12: Blattrollen-Bonitur (A) und Kohlenstoffisotopen-Diskriminierung im Korn ($\Delta^{13}C_{\text{Korn}}$, B) von gut bewässerten und trockengestressten NILs im Feld. | 21 |
| Abbildung 13: Heatmap der agronomischen Merkmale mit relativer Änderung im Vergleich von Kontrollbedingungen und Trockenbedingungen..... | 23 |
| Abbildung 14: Ertrag der Testkreuzungen der nahezu isogenen Linien (NILs) in gut bewässerten und wasserlimitierten Feldern..... | 23 |
| Abbildung 15: Blattrollen-Bonitur (A) und Kohlenstoffisotopen-Diskriminierung im Korn ($\Delta^{13}C_{\text{Korn}}$, B) von gut bewässerten und trockengestressten der MAGIC-Linien im Feld..... | 24 |
| Abbildung 16: Aktualisiertes Gantt-Diagramm..... | 26 |