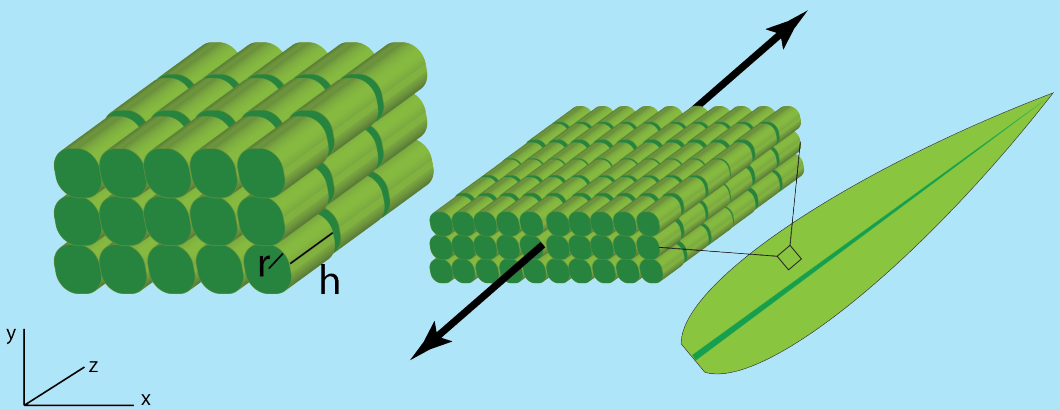


Genetische Verbesserung der Salzresistenz von Maishybriden in der ersten Phase des Salzstresses

Dissertation

Philipp T. Eitenmüller



Genetische Verbesserung der Salzresistenz von Maishybriden in der ersten Phase des Salzstresses

Dissertation zu Erlangung des Doktorgrades der Agrarwissenschaften im
Fachbereich Agrarwissenschaften, Ökotoxikologie und Umweltmanagement
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Institut für Pflanzenernährung
Prof. Dr. Sven Schubert

vorgelegt von Philipp T. Eitenmüller

2016

Für meinen Vater

Inhaltsverzeichnis

Tabellenverzeichnis	7
Abbildungsverzeichnis	8
Abkürzungsverzeichnis	14
1 Einleitung	15
2 Material und Methoden	24
2.1 Verwendete Genotypen	24
2.2 Anzuchtbedingungen	26
2.3 Wachstumsparameter	27
2.4 Bestimmung der Wachstumszone	28
2.5 Physikalische Zellwandparameter	31
2.6 Chemische Zellwandparameter	36
2.7 Kationenanalyse	42
2.8 Screening	43
2.9 Extensibilität der Zellwand verschiedener Genotypen unter Salzstress	45
2.10 DSR-Hybriden in der ersten Phase des Salzstress	45
2.11 DSR-Hybriden in der zweiten Phase des Salzstress	46
2.12 Einfluss der Calciumkonzentration unter Salzstress der ersten Phase	47
2.13 Zellteilung unter Salzstress	48
2.14 Züchtung	50
2.15 Erstellung von Doppelhaploiden	53
2.16 Statistik	55

Inhaltsverzeichnis

3	Ergebnisse	56
3.1	Versuch 1 - Ansäuerung des Apoplasten	56
3.2	Versuch 2 - Extensibilität der Zellwand	58
3.3	Versuch 3 - Calcium	62
3.4	Züchtung	73
3.5	Veränderung der Zellteilung durch Salzstress	93
4	Diskussion	95
4.1	Züchtung	95
4.2	Zellteilung und -streckung	97
4.3	Turgorschwellenwert	104
4.4	Extensibilität der wachsenden Zellwand unter Salzstress . . .	106
4.5	Einfluss von Calcium auf das Wachstum unter Salzstress . . .	109
5	Zusammenfassung	120
6	Summary	122

Tabellenverzeichnis

2.1	Verwendete Maisgenotypen	25
2.2	Anzuchtparameter in der Klimakammer	26
2.3	Zusammensetzung der Nährlösung	27
2.4	Varianten der Calcium- und NaCl-Konzentrationen	47
2.5	Zusammensetzung der Nährlösung bis zum 14. Tag	47
2.6	Zusammensetzung der Nährlösung ab dem 14. Tag	48
3.1	Anzahl der Körner aus Selbstungen (DH-Linien) und Kreuzungen (DH-Linien \times NaExII = DSR-Hybride)	73
3.2	Einfluss von Salzstress auf die Ansäuerung des Apoplasten von Pioneer 3906, DSR 3 und DSR 5 nach 21 Tagen Wachstum mit 7 Tagen 1 mM bzw. 150 mM NaCl. t-Test: $p^* \leq 5\%$	88

Abbildungsverzeichnis

1.1	Modifiziertes Modell der Wirkung von Salzstress auf die Wachstumsrate von Kulturpflanzen nach Munns (Schubert 2011) . . .	16
1.2	Elektronenmikroskopische Aufnahme einer Maiswurzel mit einem Xylemelement (Cosgrove 2005)	19
1.3	Modell der pflanzlichen Zellwand http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/e/ed/Schema_pflanzliche_Zellwand.svg	20
2.1	Pioneer 3906 nach 21 Tagen Wachstum und 24 h nach Perforation. Nummern bezeichnen Blätter chronologisch.	30
2.2	Schematischer Aufbau des neu entwickelten Extensiometers . .	32
2.3	Schnittmuster zur Segmententnahme am zweitjüngsten Blatt. Die verwendeten Segmente werden durch Pfeile angezeigt. . . .	34
2.4	Glucosekonzentration in der Zellwand, nach 21 Tagen Wachstum mit 7 Tagen 1 mM bzw. 100 mM NaCl Salzstress, ermittelt mit der Anthron- und der HPAEC-PAD-Methode.	41
2.5	Pflanzenbesatz der Screeningbehälter	44
2.6	Körner aus der Kreuzung (SWS 164 × SWS 47) × UH800 a) Krone und Scutellum farblos: Ausgekreuzt oder geselbstet b) Krone und Scutellum gefärbt: F ₁ -Hybride c) Krone gefärbt, Scutellum farblos: Haploid d) Krone farblos, Scutellum gefärbt: Embryo letal	53
3.1	Einfluss von Salzstress auf die Sprossfrischmassen verschiedener Genotypen nach 21 Tagen Wachstum mit 7 Tagen 1 mM bzw. 100 mM NaCl. t-Test: *p ≤ 5% **p ≤ 1%	56

3.2	Einfluss von Salzstress auf den apoplastischen pH-Wert verschiedener Genotypen nach 21 Tagen Wachstum mit 7 Tagen 1 mM bzw. 100 mM NaCl. t-Test: * $p \leq 5\%$	57
3.3	Einfluss von Salzstress auf die Länge des zweitjüngsten Blattes verschiedener Genotypen nach 20 Tagen Wachstum mit 7 Tagen 1 mM bzw. 100 mM NaCl. t-Test vs. Pioneer 3906: * $p \leq 5\%$ ** $p \leq 1\%$ *** $p \leq 0,05\%$	58
3.4	Einfluss von Salzstress auf die Blattlängenzunahmerate verschiedener Genotypen vom 18. auf den 20. Tag des Wachstums mit 4 bzw. 6 Tagen 1 mM bzw. 100 mM NaCl. t-Test: ** $p \leq 1\%$ *** $p \leq 0,05\%$	59
3.5	Einfluss von Salzstress auf das Verhältnis der Blattlängenzunahmeraten verschiedener Genotypen vom 18. auf den 20. Tag des Wachstum mit 4 bzw. 6 Tagen 100 mM NaCl im Vergleich zu 1 mM NaCl. t-Test: * $p \leq 5\%$ ** $p \leq 1\%$	60
3.6	Einfluss von Salzstress auf die Extensibilität der Zellwand verschiedener Genotypen nach 21 Tagen Wachstum mit 7 Tagen 1 mM bzw. 100 mM NaCl. t-Test: * $p \leq 5\%$ ** $p \leq 1\%$	61
3.7	Einfluss von Salzstress und Calciumkonzentration in der Nährlösung auf Pioneer 3906 nach 21 Tagen Wachstum mit 7 Tagen 1 mM bzw. 100 mM NaCl und 2 mM bzw. 10 mM Calcium.	62
3.8	Einfluss von Salzstress und Calciumkonzentration in der Nährlösung auf die Sprossfrischmasse von Pioneer 3906 nach 21 Tagen Wachstum mit 7 Tagen 1 mM bzw. 100 mM NaCl und 2 mM bzw. 10 mM Calcium. ANOVA: $p \leq 5\%$	63
3.9	Einfluss von Salzstress und Calciumkonzentration in der Nährlösung auf die Wurzelfrischmasse von Pioneer 3906 nach 21 Tagen Wachstum mit 7 Tagen 1 mM bzw. 100 mM NaCl und 2 mM bzw. 10 mM Calcium. ANOVA: $p \leq 5\%$	64
3.10	Einfluss von Salzstress und Calciumkonzentration in der Nährlösung auf die Zunahmerate der Blattlängen über 48 h von Pioneer 3906 nach 21 Tagen Wachstum mit 7 Tagen 1 mM bzw. 100 mM NaCl und 2 mM bzw. 10 mM Calcium. ANOVA: $p \leq 5\%$	65

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

- 3.11 Einfluss von Salzstress und Calciumkonzentration in der Nähr-
lösung auf die Extensibilität der Zellwand von Pioneer 3906
nach 21 Tagen Wachstum mit 7 Tagen 1 mM bzw. 100 mM NaCl
und 2 mM bzw. 10 mM Calcium. ANOVA: $p \leq 5\%$ 66
- 3.12 Einfluss von Salzstress und Calciumkonzentration in der Nähr-
lösung auf den Turgorschwellenwert der Zellwand von Pioneer
3906 nach 21 Tagen Wachstum mit 7 Tagen 1 mM bzw. 100
mM NaCl und 2 mM bzw. 10 mM Calcium. ANOVA: $p \leq 5\%$ 66
- 3.13 Einfluss von Salzstress und Calciumkonzentration in der Nähr-
lösung auf den Turgorschwellenwert der Zellwand von Pioneer
3906 nach 21 Tagen Wachstum 2 mM bzw. 10 mM Calcium.
ANOVA: $p \leq 5\%$; 8 Wiederholungen/Variante 67
- 3.14 Einfluss von Salzstress und Calciumkonzentration in der Nähr-
lösung auf die Cellulosekonzentration in der Zellwand von Pio-
neer 3906 nach 21 Tagen Wachstum mit 7 Tagen 1 mM bzw.
100 mM NaCl und 2 mM bzw. 10 mM Calcium. ANOVA: $p \leq 5\%$. . . 68
- 3.15 Einfluss von Salzstress und Calciumkonzentration in der Nähr-
lösung auf die Pectinkonzentration in der Zellwand von Pioneer
3906 nach 21 Tagen Wachstum mit 7 Tagen 1 mM bzw. 100
mM NaCl und 2 mM bzw. 10 mM Calcium. ANOVA: $p \leq 5\%$ 69
- 3.16 Einfluss von Salzstress und Calciumkonzentration in der Nähr-
lösung auf die Konzentration der freien Carboxylgruppen des
Pectins in der Zellwand von Pioneer 3906 nach 21 Tagen Wachs-
tum mit 7 Tagen 1 mM bzw. 100 mM NaCl und 2 mM bzw. 10
mM Calcium. ANOVA: $p \leq 5\%$ 70
- 3.17 Einfluss von Salzstress und Calciumkonzentration in der Nähr-
lösung auf die Hemicellulosekonzentration in der Zellwand von
Pioneer 3906 nach 21 Tagen Wachstum mit 7 Tagen 1 mM bzw.
100 mM NaCl und 2 mM bzw. 10 mM Calcium. ANOVA: $p \leq 5\%$. . . 71

3.18 Einfluss von Salzstress und Calciumkonzentration in der Nähr- lösung auf die Verhältnisse der Monomerkonzentrationen der Hemicellulose in der Zellwand von Pioneer 3906 nach 21 Ta- gen Wachstum mit 7 Tagen 1 mM bzw. 100 mM NaCl und 2 mM bzw. 10 mM Calcium. Variante 1 mM NaCl mit 2 mM Calci- um = 100% ANOVA: $p \leq 5\%$	72
3.19 Einfluss von Salzstress nach 21 Tagen Wachstum mit 7 Tagen 1mM bzw. 150 mM NaCl. a) Pioneer 3906 b) DSR 1 c) DSR 2 d) DSR 3 e) DSR 4 f) DSR 5 Jeweils 1 mM NaCl links, 150 mM NaCl rechts	74
3.20 Einfluss von Salzstress auf die Sprossfrischmassen von Pio- neer 3906 und der neu entwickelten DSR-Hybriden nach 21 Ta- gen Wachstum mit 7 Tagen 1 mM bzw. 150 mM NaCl. t-Test: p^{***} $\leq 0,05\%$	75
3.21 Einfluss von Salzstress auf das Verhältnis der Sprossfrischmas- sen 150 mM NaCl/1 mM NaCl von Pioneer 3906 und der neu entwickelten DSR-Hybriden nach 21 Tagen Wachstum mit 7 Ta- gen 1 mM bzw. 150 mM NaCl. t-Test: $p^* \leq 5\%$ $p^{**} \leq 1\%$ $p^{***} \leq 0,05\%$.	75
3.22 Einfluss von Salzstress auf die Wurzelfrischmassen von Pio- neer 3906 und der neu entwickelten DSR-Hybriden nach 21 Ta- gen Wachstum mit 7 Tagen 1 mM bzw. 150 mM NaCl. t-Test: p^{**} $\leq 1\%$ $p^{***} \leq 0,05\%$	77
3.23 Einfluss von Salzstress auf das Verhältnis der Wurzelfrischmas- sen 150 mM NaCl/1 mM NaCl von Pioneer 3906 und der neu entwickelten DSR-Hybriden nach 21 Tagen Wachstum mit 7 Ta- gen 1 mM bzw. 150 mM NaCl. t-Test: $p^* \leq 5\%$ $p^{**} \leq 1\%$ $p^{***} \leq 0,05\%$.	77
3.24 Einfluss von Salzstress auf die Natriumkonzentration im Spross von Pioneer 3906 und der neu entwickelten DSR-Hybriden nach 21 Tagen Wachstum mit 7 Tagen 150 mM NaCl. t-Test: $p^{**} \leq 1\%$.	79
3.25 Einfluss von Salzstress auf die Natriumkonzentration in der Wur- zel von Pioneer 3906 und der neu entwickelten DSR-Hybriden nach 21 Tagen Wachstum mit 7 Tagen 150 mM NaCl. t-Test: p^{**} $\leq 1\%$ $p^{***} \leq 0,05\%$	79

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

- 3.26 Einfluss von Salzstress auf den Natriumgehalt in der Gesamtpflanze (Spross und Wurzel) von Pioneer 3906 und der neu entwickelten DSR-Hybriden nach 21 Tagen Wachstum mit 7 Tagen 150 mM NaCl. t-Test: $p^* \leq 5\%$ $p^{**} \leq 1\%$ 81
- 3.27 Einfluss von Salzstress auf die Natriumverlagerung von Pioneer 3906 und der neu entwickelten DSR-Hybriden nach 21 Tagen Wachstum mit 7 Tagen 150 mM NaCl. t-Test: $p^* \leq 5\%$ $p^{**} \leq 1\%$. . . 81
- 3.28 Einfluss von Salzstress auf die Natriumaufnahme (Natriumgehalt der Gesamtpflanze/Wurzeltrockenmasse) von Pioneer 3906 und der neu entwickelten DSR-Hybriden nach 21 Tagen Wachstum mit 7 Tagen 150 mM NaCl. t-Test: $p^* \leq 5\%$ $p^{**} \leq 1\%$ 82
- 3.29 Einfluss von Salzstress auf die Sprossfrischmassen von Pioneer 3906, DSR 3 und DSR 5 nach 21 Tagen Wachstum mit 7 Tagen 1mM bzw. 150 mM NaCl. t-Test: $p^{***} \leq 0,05\%$ 83
- 3.30 Einfluss von Salzstress auf das Verhältnis der Sprossfrischmassen 1 mM NaCl/150 mM NaCl von Pioneer 3906, DSR 3 und DSR 5 nach 21 Tagen Wachstum mit 7 Tagen 1mM bzw. 150 mM NaCl. t-Test: $p^{***} \leq 0,05\%$ 83
- 3.31 Einfluss von Salzstress auf das Verhältnis der Blattflächen 150 mM NaCl/1 mM NaCl von Pioneer 3906, DSR 3 und DSR 5 nach 21 Tagen Wachstum mit 7 Tagen 1mM bzw. 150 mM NaCl. t-Test: $p^* \leq 5\%$ 85
- 3.32 Einfluss von Salzstress auf das Verhältnis der Blattflächenzunahmerate 150 mM NaCl/1 mM NaCl von Pioneer 3906, DSR 3 und DSR 5 nach 21 Tagen Wachstum mit 7 Tagen 1 mM bzw. 150 mM NaCl. t-Test: $p^* \leq 5\%$ 85
- 3.33 Einfluss von Salzstress auf die Extensibilität der Zellwand von Pioneer 3906, DSR 3 und DSR 5 nach 21 Tagen Wachstum mit 7 Tagen 1 mM bzw. 150 mM NaCl. t-Test: $p^* \leq 5\%$ $p^{***} \leq 0,05\%$. . . 87
- 3.34 Einfluss von Salzstress auf die Cellulosekonzentration in der Zellwand von Pioneer 3906, DSR 3 und DSR 5 nach 21 Tagen Wachstum mit 7 Tagen 1 mM bzw. 150 mM NaCl. t-Test: $p^* \leq 5\%$. 89

3.35 Einfluss von Salzstress auf die Arabinosekonzentration in der Zellwand von Pioneer 3906, DSR 3 und DSR 5 nach 21 Tagen Wachstum mit 7 Tagen 1 mM bzw. 150 mM NaCl. t-Test: $p^* \leq 5\%$	90
3.36 Einfluss von Salzstress auf die Pectinkonzentration in der Zellwand von Pioneer 3906, DSR 3 und DSR 5 nach 21 Tagen Wachstum mit 7 Tagen 1 mM bzw. 150 mM NaCl.	91
3.37 Einfluss von Salzstress auf die Konzentration der freien Carboxylgruppen des Pectins in der Zellwand von Pioneer 3906, DSR 3 und DSR 5 nach 21 Tagen Wachstum mit 7 Tagen 1 mM bzw. 150 mM NaCl.	92
3.38 Einfluss von Salzstress auf den DNA-Gehalt im Spross von Pioneer 3906 nach 21 Tagen Wachstum mit 7 Tagen 1 mM bzw. 150 mM NaCl. t-Test: $p^* \leq 5\%$, 2-seitiger t-Test	93
3.39 Einfluss von Salzstress auf die DNA-Konzentration in der Sprossfrischmasse von Pioneer 3906 nach 21 Tagen Wachstum mit 7 Tagen 1 mM bzw. 150 mM NaCl. t-Test: $p^* \leq 5\%$, 2-seitiger t-Test	94
4.1 Vergleich der Verhältnisse des Zellvolumens 150 mM/1 mM NaCl im Spross von Pioneer 3906 nach 21 Tagen Wachstum mit 7 Tagen 1 mM bzw. 150 mM NaCl. Errechnet aus Extensibilität und DNA-Konzentration.	99
4.2 Schema der Größenveränderung in Blattsegmenten. x: Segmentbreite, y: Blattdicke, z: Segmentlänge, Pfeile: Zugrichtung	100
4.3 Gemessene Frischmasse und aus Zellzahl und Zellvolumenabnahme errechnete Frischmasse von Pioneer 3906 nach 21 Tagen Wachstum mit 7 Tagen 1 mM bzw. 150 mM NaCl.	103
4.4 Zusammenhang von Turgor, Turgorschwellenwert und Extensibilität der Zellwand in Bezug auf die Wachstumsrate (nach Cosgrove 1993a)	105

Abkürzungsverzeichnis

DH	Doppelhaploid
DSR	Doppelhaploid Salzresistent
m	Extensibilität
HPAEC	High Precision Anion Exchange Chromatography
PAD	Pulsed Amperometric Detection
NaExII	Natrium exkludierende Inzuchtlinie
SR	Salzresistent
Y	Turgorschwellenwert
Ψ_p	Turgor

1 Einleitung

Stets findet Überraschung statt,
da, wo man's nicht erwartet hat.

-Wilhelm Busch

Wenn man es nicht wenigstens versucht,
dann kann man noch nicht mal scheitern.

-Reinhold Messner

Hohe Salzkonzentrationen im Boden sind ein großes Problem mit weltweitem Ausmaß. Bis zu 3,1% des nutzbaren Ackerbodens sind hiervon betroffen (FAO 2015), wobei Salzstress vor allem ein Problem arider Klimate ist. Hier kommt es, durch eine größere Verdunstung von Wasser aus dem Boden, als von Niederschlägen nachgeliefert wird, zu einer Akkumulation von Ionen im fruchtbaren Oberboden und somit zu einer Verschlechterung der Bodeneigenschaften für Kulturpflanzen. Eine Intensivierung dieses Problems tritt auf, wenn kapillar aufgestiegenes Grundwasser an der Bodenoberfläche verdunstet und seine Salzfracht an der Bodenoberfläche zurück bleibt (Schubert 1999). Dieser Effekt wird häufig zusätzlich durch unsachgemäß ausgeführte Bewässerungspraktiken, wie das Überfluten von Feldern, ausgelöst und verstärkt. Fast alle unserer Kulturpflanzen reagieren mit einer Wachstumsreduktion auf diese Art von abiotischem Stress.

Ein Großteil der ariden Gebiete ist durch kleinbäuerliche Strukturen geprägt, was eine Melioration der Böden auf Grund der Kosten nahezu unmöglich macht. Weiterhin ist in diesen Regionen zumeist kein Wasser in ausreichender Qualität und Menge für eine Melioration vorhanden (Qadir *et al.* 2006). Um hier eine ertragreiche Landwirtschaft betreiben zu können, besteht ein

1 Einleitung

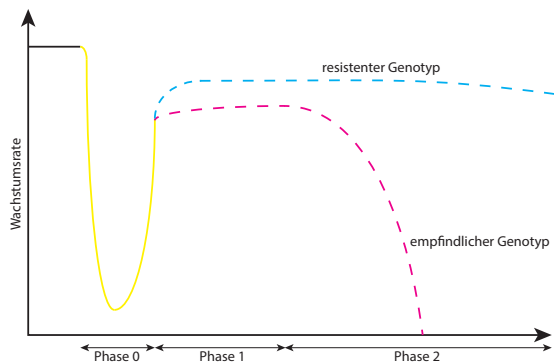


Abbildung 1.1: Modifiziertes Modell der Wirkung von Salzstress auf die Wachstumsrate von Kulturpflanzen nach Munns (Schubert 2011)

Weg in der Entwicklung salzresistenter Kulturpflanzen, die den Landwirten die Möglichkeit geben auf Grund von Salinität brachliegende Flächen wieder zu bewirtschaften. Um jedoch salzresistente Kulturpflanzen zu züchten, müssen zuerst die grundlegenden Wirkungen von Salzstress auf Pflanzen verstanden werden.

Salzstress bei Pflanzen kann nach dem modifizierten Modell nach Munns in mehrere Phasen eingeteilt werden (Abb. 1.1) (Munns 1993). Direkt nach der Zugabe von Salz in das Nährmedium kommt es, durch ein starkes Abfallen des osmotischen Potentials, zu einem Einbruch des Wachstums, die Phase 0 (Schubert 2011). Nach einigen Stunden bis Tagen kann das Wachstum durch Anpassung der Pflanze an die neuen Gegebenheiten wieder hergestellt werden, jedoch auf einem geringeren Niveau, und geht in die 1. Phase des Salzstress über. Diese Phase ist geprägt von osmotischem Stress, welcher sich bei Mais (*Zea mays*), zusätzlich zu einem reduzierten Wachstum,

in einer dunkelgrünen Verfärbung der Blätter zeigt. Die genauen Mechanismen, die zu einem vermindertem Wachstum unter Salzstress der ersten Phase führen, sind bislang nicht vollständig bekannt (Munns & Tester 2008). Je nach Stressintensität kommt es nach einigen Tagen bis Wochen zu einem fließenden Übergang in die 2. Phase, in welcher Ionentoxizität vorherrscht und trockene Nekrosen an den Blatträndern sichtbar werden. Die Toxizität ist bei Mais auf Na^+ -Ionen zurückzuführen, während gegenüber Cl^- -Ionen eine Umempfindlichkeit besteht (Fortmeier & Schubert 1995; Sümer *et al.* 2004). Unter Salzstress kann zwischen resistenten und empfindlichen Genotypen unterschieden werden. Während resistente Genotypen ihren Lebenszyklus abschließen können, kommt bei empfindlichen Genotypen das Wachstum vollständig zum Erliegen (Munns & Tester 2008).

Ein nach dieser Definition resistenter Maisgenotyp ist Pioneer 3906 (cv. Ornella). Um eine Resistenz in der zweiten Phase des Salzstresses zu erreichen, verfolgt dieser Genotyp zwei Strategien, welche beide zum Ziel haben die Natriumkonzentration im Cytoplasma der Zellen des Sprosses möglichst gering zu halten. Zum einen erfolgt eine Exklusion von Natrium an der Wurzeloberfläche. Hierbei werden Na^+ -Ionen passiv an der Wurzeloberfläche ausgeschlossen, was zu einer verminderten Aufnahme von Natrium in die Pflanze führt (Schubert & Läuchli 1988). Die zweite Strategie stellt eine verminderte Wurzel-zu-Spross-Verlagerung von Natrium dar. Dies wird durch die Inklusion von aufgenommenen Na^+ -Ionen in die Vakuolen der Cortezellen und der Xylemparenchymzellen durch einen Antiport mit H^+ realisiert (Neubert *et al.* 2005). Somit können toxische Konzentrationen von Natrium im Spross vermieden werden.

Trotz des Vermeidens von toxischen Natriumkonzentrationen im Spross ist das Wachstum von Pioneer 3906 unter Salzstress eingeschränkt. Es kann eine starke Reduktion der Frischmasse und Blattfläche beobachtet werden, ohne dass Toxizitätssymptome der zweiten Phase auftreten. Somit stellt eine Verbesserung der Resistenz in der ersten Phase des Salzstresses eine vielversprechende Möglichkeit dar (Schubert *et al.* 2009), um das Wachstum von Mais unter Salzstress zu verbessern.

Ein möglicher Weg, die Resistenz in der ersten Phase des Salzstresses zu verbessern, besteht darin, Hybriden mit den Strategien aus Pioneer 3906 und

1 Einleitung

osmotisch resistenten Linien zu erzeugen. Da Pioneer 3906 jedoch eine Hybride darstellt, ist das resultierende Kreuzungsprodukt auf Grund von genetischer Aufspaltung nicht für Versuchszwecke geeignet. Für eine homogene Hybridzüchtung müssen Linien genutzt werden. Die Strategien der Natriumexklusion an der Wurzeloberfläche und die der verminderten Verlagerung von Natrium aus der Wurzel in den Spross stammen aus den beiden Elternlinien von Pioneer 3906 (Schubert *et al.* 2009). Die Elternlinie Pioneer 165 zeigt eine verminderte Natriumaufnahme in die Wurzel, während die Elternlinie Pioneer 605 eine verminderte Verlagerung von Natrium aus der Wurzel in den Spross aufweist (Schubert *et al.* 2009). Um beide Eigenschaften in einer Linie zu vereinen, wurde Pioneer 3906 über acht Generationen geselbstet und einer rekurrenten Selektion unterzogen. Als Selektionsmerkmal wurde die Na^+ -Konzentration im 4. Blatt genutzt, da dieses einen guten Indikator sowohl für die Natriumexklusion an der Wurzeloberfläche, als auch für eine verminderte Wurzel-zu-Spross-Verlagerung darstellt (Schubert *et al.* 2009). Die so erhaltene Natrium exkludierende Inzuchtlinie (NaExII) zeigt im Vergleich mit Pioneer 3906 eine signifikant verminderte Aufnahme von Na^+ an der Wurzeloberfläche und eine signifikant verminderte Wurzel-zu-Spross-Verlagerung von Na^+ (Schubert *et al.* 2009).

NaExII wurde mit verschiedenen Linien der SWS GbR (Rastatt) gekreuzt, die sich in einem Screening von 200 Linien als besonders osmotisch resistent erwiesen (Schubert *et al.* 2009). Die hieraus erhaltenen salzresistenten Hybriden (SR-Hybriden) weisen sowohl in der ersten als auch der zweiten Phase des Salzstress eine verbesserte Resistenz im Vergleich mit Pioneer 3906 auf (Schubert *et al.* 2009). Dieses Ergebnis zeigt, dass auch unter Salzstress der ersten Phase eine Resistenz möglich ist. Es konnte jedoch keine befriedigende Resistenz erreicht werden. Um dieses Ziel zu erreichen, müssen zunächst die physiologischen Vorgänge verstanden werden, die zu einer Verbesserung der Salzresistenz in der ersten Phase führen (Schubert *et al.* 2009).

Wachstum kann unterteilt werden in die Zellteilung und die Zellstreckung. Die Zellteilung legt den Grundstock an Zellen, welche expandieren können (Schopfer 1989). Ist die Zellteilung unter Salzstress der ersten Phase gestört und somit die Zellzahl vermindert, sollte auch das Wachstum vermindert sein, da weniger Zellen vorhanden sind, die expandieren können.

Hypothese 1: Salzstress der ersten Phase führt zu einer verminderten Zellteilung.

Das Streckungswachstum und somit die Volumenzunahme, wird in Pflanzen durch die Expansion der Zellwand begrenzt. Eine pflanzliche Zelle wächst im Normalfall um das 10 bis 100fache ihrer ursprünglichen Größe (Taiz & Zeiger 2006). Eine der wohl beeindruckendsten Volumenzunahmen von Pflanzenzellen ist die von Mais-Xylemzellen (Abb. 1.2), welche eine bis zu 10.000fache Vergrößerung ihres Volumens erfahren, ausgehend von dem Volumen einer meristematischen Zelle (Cosgrove 2005).

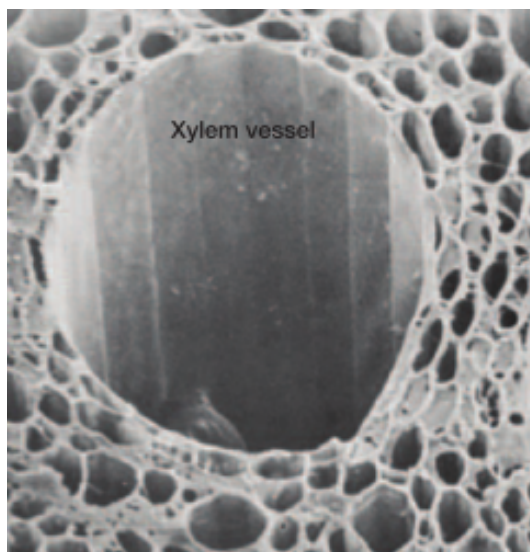


Abbildung 1.2: Elektronenmikroskopische Aufnahme einer Maiswurzel mit einem Xylemelement (Cosgrove 2005)

Um diese Volumenzunahme zu bewerkstelligen, muss die Zellwand als physikalische Begrenzung der pflanzlichen Zelle erweitert werden (Cosgrove 2005), Die pflanzliche Zellwand ist aufgebaut aus einem Gerüst aus Cellulosemikrofibrillen, welche über Hemicellulose, Pectin und phenolische Verbindungen

1 Einleitung

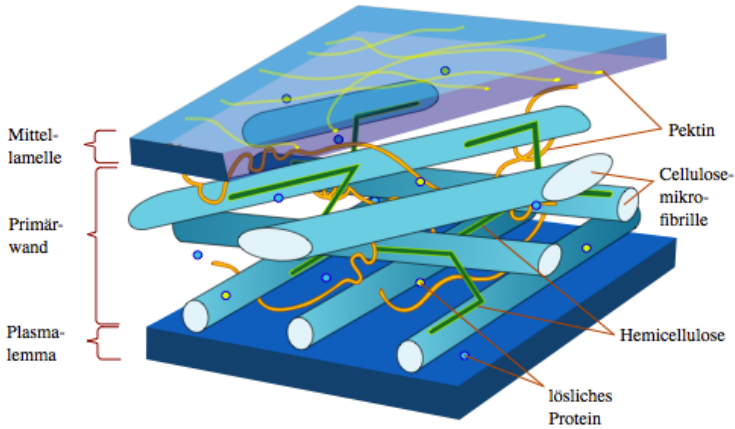


Abbildung 1.3: Modell der pflanzlichen Zellwand
http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/e/ed/Schema_pflanzliche_Zellwand.svg

verknüpft sind (Abb. 1.3) (Carpita 1996). Die im Wachstum befindliche Zellwand stellt ein äußerst flexibles Konstrukt dar, welches durch ein Zusammenspiel aus mehreren Faktoren zum Wachstum angeregt werden kann. Trotz der großen Wachstumsleistung der Zellwand erfährt diese keine Veränderung der Dicke (ca. $0,1 \mu\text{m}$ (McCann *et al.* 1990)) bis das Wachstums abgeschlossen ist, da kontinuierlich neue Bausteine synthetisiert und in die Zellwand eingelagert werden (Cosgrove 2005). Erst nach Abschluss des Wachstums und mit Auflagerung der Sekundärwand wird die Zellwand signifikant dicker. Die auf das Wachstum der Zellwand wirkenden physikalischen Faktoren können durch die Lockhart-Gleichung (1.1) beschrieben werden (Lockhart 1965).

$$dV/dt = m(\Psi_p - Y) \quad (1.1)$$

V: Volumen; t: Zeit; m: Extensibilität; Ψ_p : Turgor; Y: Turgorschwellenwert

Hierin wird die Volumenveränderung pro Zeit ausgedrückt, die abhängig ist von der Extensibilität der Zellwand, multipliziert mit der Differenz aus Turgor und Turgorschwellenwert, dem wachstumswirksamen Turgor.

Durch eine Erhöhung der Salzkonzentration im Wurzelmedium wird das Wasserpotential abgesenkt. Auf Grund der starken osmotischen Wirkung des Wurzelmediums auf die Wurzel könnte es zu einem Einbruch des Turgors unter Salzstress kommen. Es konnte gezeigt werden, dass unter Salzstress keine Veränderung des Turgors festzustellen ist (Termaat *et al.* 1985; Cramer & Bowman 1991; De Costa *et al.* 2007). Maispflanzen ist es anscheinend möglich, den osmotischen Stress durch Akkumulation von kompatiblen gelösten Stoffen auszugleichen und somit den Turgor aufrecht zu erhalten (Fortmeier & Schubert 1995). Somit bleiben für eine Veränderung des Wachstums die Faktoren des Turgorschwellenwertes (Y) und der Zellwandextensibilität (m). Sollte der Turgorschwellenwert unter Salzstress erhöht sein, ist der resultierende wachstumswirksame Turgor und somit auch das Streckungswachstum vermindert.

Hypothese 2: Salzstress der ersten Phase erhöht den Turgorschwellenwert der wachsenden Zellwand von Mais

Sollte als weiterer Einflussfaktor die Zellwandextensibilität unter Salzstress vermindert sein, kann hierdurch das verminderte Wachstum unter Salzstress der ersten Phase erklärt werden.

Hypothese 3: Salzstress der ersten Phase vermindert die Extensibilität der wachsenden Zellwand von Mais

Einen Hinweis auf eine verminderte Zellwandextensibilität liefern die Arbeiten von Pitann *et al.* (2009) und Hatzig *et al.* (2010). Nach Hager *et al.* (2003) wird ein Wachstum der Zellwand durch die Ansäuerung des Apoplasten erreicht. Hierdurch werden Expansine aktiviert, die bestehende Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Cellulosemikrofibrillen und Hemicellulose aufbrechen (Cosgrove 2000b). Die aufgeweichte Zellwand kann so ein Wachstum erfahren. Pitann *et al.* (2009) konnten zeigen, dass Salzstress zu einer Verminderung der apoplastischen Ansäuerung bei dem in der ersten Phase des Salzstresses empfindlichen Genotypen Pioneer 3906 führt. Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass der in der ersten Phase des Salzstresses relativ resistente Ge-

notyp SR 03 die Ansäuerung des Apoplasten aufrecht erhält. Hatzig *et al.* (2010) konnten hingegen zeigen, dass der dem Genotypen SR 03 ähnlich resistente Genotyp SR 12 unter Salzstress der ersten Phase, wie Pioneer 3906, mit einer verminderten apoplastischen Ansäuerung reagiert. Somit muss geschlossen werden, dass die Ansäuerung des Apoplasten unter Salzstress nicht der einzige Einflussfaktor auf die Extensibilität der Zellwand sein kann. Eine weitere Möglichkeit ist die Zusammensetzung der wachsenden Zellwand. SR 03 und SR 12 unterscheiden sich in der Zusammensetzung der wachsenden Zellwand unter Salzstress der ersten Phase dahingehend, dass SR 12 mit einer Erhöhung der Arabinosekonzentration reagiert (Uddin 2012; Uddin *et al.* 2013). Hierdurch wird verhindert, dass Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Hemicellulose und Cellulose ausgebildet werden können (Carpita *et al.* 1982). Somit könnte die apoplastische Ansäuerung und die verminderte Expansinaktivität durch diese vorgelagerte chemische Veränderung der Zellwand ausgeglichen werden. Eine Kombination der Ansäuerung des Apoplasten bei einer zusätzlich veränderten Zellwand sollte zu einer erhöhten Resistenz führen.

Hypothese 4: Die Kombination von aufrechterhaltener apoplastischer Ansäuerung und gleichzeitiger Erhöhung der Arabinosekonzentration der Zellwand führt zu einem verbesserten Wachstum in der ersten Phase des Salzstresses

Zum Testen dieser Hypothese wurden in dieser Arbeit neue salzresistente Genotypen erstellt, welche die Eigenschaften der Ansäuerung des Apoplasten sowie die Erhöhung der Arabinosekonzentration in der Zellwand in sich vereinen. Hierfür wurden die Mutterlinien von SR 03 und SR 12 (SWS 47 und SWS 164) gekreuzt und aus dem Kreuzungsprodukt mit Hilfe der Doppelhaploidentechnik neue Linien erstellt. Diese neu erstellten Linien wurden mit NaExII gekreuzt und somit neue salzresistente Maishybriden erstellt. Diese neu erstellten Hybriden wurden auf ihre Eigenschaften hinsichtlich der Salzresistenz untersucht. Hier galt neben einer Salzresistenz in der zweiten Phase, das Augenmerk der apoplastischen Ansäuerung, der Zellwandzusammensetzung und der Extensibilität der Zellwand in der ersten Phase des Salzstresses.

In der ersten Phase des Salzstresses ist die Cellulosekonzentration bei Mais vermindert (Uddin *et al.* 2013). Diese Reaktion konnte sowohl für den salzempfindlichen Genotypen Pioneer 3906 als auch für die salzresistenten Genotypen SR 03 und SR 12 nachgewiesen werden. Durch Salzstress wird der Einbau von Glucosemonomeren in Cellulose vermindert (Zhong & Läuchli 1988). Möglicherweise ist auf Grund dieser Veränderung die Extensibilität der Zellwand vermindert. Die geringere Konzentration der Cellulosemikrofibrillen könnte durch eine unverändert hohe Konzentration der restlichen Zellwandbestandteile stärker vernetzt und die Extensibilität somit vermindert werden. Durch eine erhöhte Gabe von Calcium unter Salzstress konnte bei Baumwollwurzeln das Wachstum und die Konzentration von Cellulose in der Zellwand wieder hergestellt werden (Zhong & Läuchli 1988). Sollte dieses Ergebnis bei Mais analog ausfallen, kann davon ausgegangen werden, dass eine Verminderung der Cellulosekonzentration zu einer verminderten Zellwandextensibilität führt.

Hypothese 5: Eine Verminderung der Cellulosekonzentration führt zu einer verminderten Zellwandextensibilität.

Zum Testen dieser Hypothese wurde Pioneer 3906 mit und ohne Salzstress unter Calciummangel und guter Calciumversorgung angezogen. Die Pflanzen wurden auf ihre Zellwandzusammensetzung und die Extensibilität der Zellwand untersucht.

2 Material und Methoden

2.1 Verwendete Genotypen

Zum Testen der Hypothesen wurden verschiedene Maisgenotypen (*Zea mays* L.) mit ähnlicher Abstammung genutzt. Als Grundlage diente der Genotyp Pioneer 3906 (cv. Ornella). Dieser Genotyp stellt die Kreuzung aus den Linien Pioneer 165 × Pioneer 605 dar. Pioneer 3906 zeichnet sich durch eine verminderte Na⁺-Aufnahme an der Wurzeloberfläche sowie eine verminderte Wurzel-zu-Spross-Verlagerung von Na⁺ im Vergleich mit sensitiven Genotypen aus und ist in der zweiten Phase des Salzstresses resistent (Schubert *et al.* 2009).

Aus dem Genotypen Pioneer 3906 wurde durch rekurrente Selektion über acht Generationen die Natrium exkludierende Inzuchtlinie (NaExII) erstellt, welche gegenüber Pioneer 3906 eine signifikant verminderte Aufnahme von Na⁺ an der Wurzeloberfläche und eine signifikant verminderte Wurzel-zu-Spross-Verlagerung von Na⁺ aufweist (Schubert *et al.* 2009). Da es sich um eine Linie handelt ist es möglich Kreuzungen mit anderen Linien durchzuführen und hieraus Hybridsaatgut zu erhalten (Hallauer *et al.* 2010).

Für die Kreuzungen mit NaExII wurden die Linien SWS 47 und SWS 164 genutzt. Diese Linien wurden als besonders osmotisch resistente aus 200 Linien der SWS GmbH Rastatt in einem Screening ermittelt (Schubert *et al.* 2009).

Die aus den Kreuzungen von NaExII mit den SWS-Linien SWS 47 und SWS 164 hervorgehenden Hybriden SR 03 und SR 12 zeichnen sich sowohl durch eine signifikant verminderte Aufnahme von Na⁺ an der Wurzeloberfläche und eine signifikant verminderte Wurzel-zu-Spross-Verlagerung, sowie eine signifikant verbesserte Resistenz in der ersten Phase des Salzstresses im Vergleich mit Pioneer 3906 aus (Schubert *et al.* 2009). Die Hybride SR 03 zeigt

2.1 Verwendete Genotypen

unter Salzstress eine aufrechterhaltene Ansäuerung der Zellwand, während die Ansäuerung bei Pioneer 3906 und SR 12 unter diesen Bedingungen einbricht (Pitann *et al.* 2009). Die Hybride SR 12 zeichnet sich, trotz der verminderten apoplastischen Ansäuerung, durch eine ähnlich hohe Resistenz wie SR 03 unter Salzstress aus. Es konnte jedoch eine Erhöhung der Arabinosekonzentration in der Zellwand unter Salzstress der ersten Phase festgestellt werden (Uddin *et al.* 2013).

SWS X ist die Kreuzung aus den Linien SWS 47 \times SWS 164. Diese Hybride (SWS X) wurde genutzt, um durch Bildung von doppelhaploiden Linien (DH-Linien) die Eigenschaften von SR 03 (apoplastische Ansäuerung) und SR 12 (Erhöhung der Arabinosekonzentration) in Bezug auf die erste Phase in einer Linie (DH-Linie) zu vereinen.

Die DSR-Hybriden wurden durch Kreuzung der DH-Linien mit NaExII erstellt. Diese Hybriden sollen die Eigenschaften von SR 03 und SR 12 in Bezug auf die Salzresistenz in der ersten und zweiten Phase in sich vereinen.

Tabelle 2.1: Verwendete Maisgenotypen

Hybriden	Abstammung	Linien
Pioneer 3906 (cv. Ornella)	P 165 \times P 605	NaExII
SR 03	SWS 47 \times NaExII	SWS 47
SR 12	SWS 164 \times NaExII	SWS 164
DSR 1	DH 1 \times NaExII	DH 1
DSR 2	DH 2 \times NaExII	DH 2
DSR 3	DH 3 \times NaExII	DH 3
DSR 4	DH 4 \times NaExII	DH 4
DSR 5	DH 5 \times NaExII	DH 5
SWS X	SWS 47 \times SWS 164	

2.2 Anzuchtbedingungen

2.2.1 Klimakammerbedingungen

Die Experimente dieser Arbeit wurden, wenn nicht anders angegeben, mit folgenden Klimakammerbedingungen durchgeführt:

Tabelle 2.2: Anzuchtparameter in der Klimakammer

Parameter	Tag (16 h)	Nacht (8 h)
Temperatur	26°C	18°C
Relative Luftfeuchte	50%	50%
Licht	200 W/m ²	0 W/m ²

2.2.2 Standard-Anzucht für 100 mM Salzstress

Die Standard-Anzucht der Klimakammerversuche mit 100 mM NaCl wurde nach folgendem zeitlichem Schema durchgeführt:

- Tag 1: Quellen des Saatguts in 1 mM CaSO₄-Lösung über Nacht
- Tag 1: Überführen der Körner in Sandwichkultur mit 1 mM CaSO₄-Lösung, abgedunkelt in der Klimakammer
- Tag 3: Belichten der Sandwichkultur
- Tag 6: Einsetzen der gekeimten Pflanzen in $\frac{1}{4}$ konzentrierte Nährlösung
- Tag 8: Erhöhen auf $\frac{1}{2}$ konzentrierte Nährlösung
- Tag 10: Erhöhen auf die volle Nährlösungskonzentration
- Tag 13: Applikation von 25 mM NaCl in der Behandlung und Wechsel der Nährlösung
- Tag 14: Erhöhen der NaCl-Konzentration auf 50 mM
- Tag 15: Erhöhen der NaCl-Konzentration auf 75 mM
- Tag 16: Erhöhen der NaCl-Konzentration auf 100 mM und Wechsel der Nährlösung
- Tag 20: Nährlösungswechsel
- Tag 21: Ernte

2.2.3 Standard-Anzucht für 150 mM Salzstress

Die Standard-Anzucht der Klimakammerversuche mit 150 mM NaCl wurde nach folgendem zeitlichem Schema durchgeführt:

2.3 Wachstumsparameter

Quellen des Saatguts in 1 mM CaSO₄-Lösung über Nacht

Tag 1: Überführen der Körner in Sandwichkultur mit 1 mM CaSO₄-Lösung, abgedunkelt in der Klimakammer

Tag 3: Belichten der Sandwichkultur

Tag 6: Einsetzen der gekeimten Pflanzen in $\frac{1}{4}$ konzentrierte Nährlösung

Tag 8: Erhöhen auf $\frac{1}{2}$ konzentrierte Nährlösung

Tag 10: Erhöhen auf die volle Nährlösungskonzentration

Tag 13: Applikation von 30 mM NaCl in der Behandlung und Wechsel der Nährlösung

Tag 14: Erhöhen der NaCl-Konzentration auf 60 mM

Tag 15: Erhöhen der NaCl-Konzentration auf 90 mM

Tag 16: Erhöhen der NaCl-Konzentration auf 120 mM und Wechsel der Nährlösung

Tag 17: Erhöhen der NaCl-Konzentration auf 150 mM

Tag 20: Nährlösungswechsel

Tag 22: Ernte

2.2.4 Standard-Nährlösung

Tabelle 2.3: Zusammensetzung der Nährlösung

Substanz	Konzentration (mM)	Substanz	Konzentration (μ M)
Ca(NO ₃) ₂	2,0	H ₃ BO ₄	1,0
K ₂ SO ₄	1,0	MnSO ₄	2,0
MgSO ₄	0,75	ZnSO ₄	0,5
CaCl ₂	2,0	CuSO ₄	0,3
KH ₂ PO ₄	0,2	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄	0,01
Na ₂ SiO ₃	1,0	NiSO ₄	0,1
		Fe-EDTA	0,2

2.3 Wachstumsparameter

2.3.1 Blattflächen

Die Blattflächen wurden durch Messung der Länge und Breite der Blattspreite erfasst. Die Messung der Blattlänge wurde vom Blattöhrchen bis zur Blattspitze durchgeführt. Die Länge junger Blätter, ohne ausgebildetes Blattöhrchen, wurde vom Blattöhrchen des letzten voll entwickelten Blattes ausgehend gemessen. Die Breite der Blätter wurde an ihrer jeweils breitesten Stelle ermittelt. Die Berechnung erfolgte auf Grund der Annahme des Maisblattes als Dreieck

2 Material und Methoden

(Formel 2.1). Die ersten zwei Laubblätter wurden bei der Messung der Blattflächen ausgelassen, da diese nicht unter Salzstressbehandlung gewachsen waren. Aus den gemessenen Blattflächen an zwei Terminen konnte die Blattflächenzunahmerate ermittelt werden (Formel 2.2).

$$A = \frac{l \cdot b}{2} \quad (2.1)$$

A: Blattfläche (cm²); l: Blattlänge (cm); b: Blattbreite (cm)

$$A_{1,2} = \frac{A_1 - A_2}{t} \quad (2.2)$$

A: Blattfläche (cm²); t: Zeit (h)

2.3.2 Pflanzenhöhe

Die Erfassung der Pflanzenhöhen wurde jeweils von der Sprossbasis bis zur Spitze des längsten Blattes und von der Sprossbasis bis zur Spitze des jüngsten Blattes durchgeführt. Aus den ermittelten Werten der Pflanzen eines Gefäßes wurde jeweils der Mittelwert gebildet.

2.3.3 Frischmasse

Die Frischmassen wurden durch Wägung erfasst. Vor der Wägung der Wurzeln wurden diese mit saugfähigem Papier vorsichtig abgetupft.

2.3.4 Trockenmasse

Die Erfassung der Trockenmassen erfolgte nach Trocknung bei 105 °C bis zur Gewichtskonstanz.

2.4 Bestimmung der Wachstumszone

Um aussagekräftige Messungen über die aktuellen Vorgänge in wachsendem Gewebe zu erhalten, müssen Messungen in der Zone des Streckungswachs-

2.4 Bestimmung der Wachstumszone

tums (Wachstumszone) der Pflanze vorgenommen werden. Um diese Wachstumszone eindeutig zu identifizieren, wurde die Nadelstichtechnik verwendet. Hierbei wird der Spross der Pflanze mit einer Kanüle im Abstand von 1 cm perforiert. Nach 24 h wurden die einzelnen Blätter des Sprosses freipräpariert und die Abstände der Einstiche gemessen (Abb. 2.1). Bereiche, in denen die Abstände größer als 1 cm waren, waren in den letzten 24 h gewachsen und gehörten somit zur Wachstumszone. Hierbei konnte festgestellt werden, dass sich die Wachstumszone am 21. Tag des Wachstums bei Mais im unteren Bereich des Sprosses befand. Die Wachstumszone reichte vom Apex bis zu den letzten voll entwickelten Blattöhrchen. Blätter, die Blattöhrchen angelegt hatten, hatten ihr Streckungswachstum abgeschlossen.

2 Material und Methoden

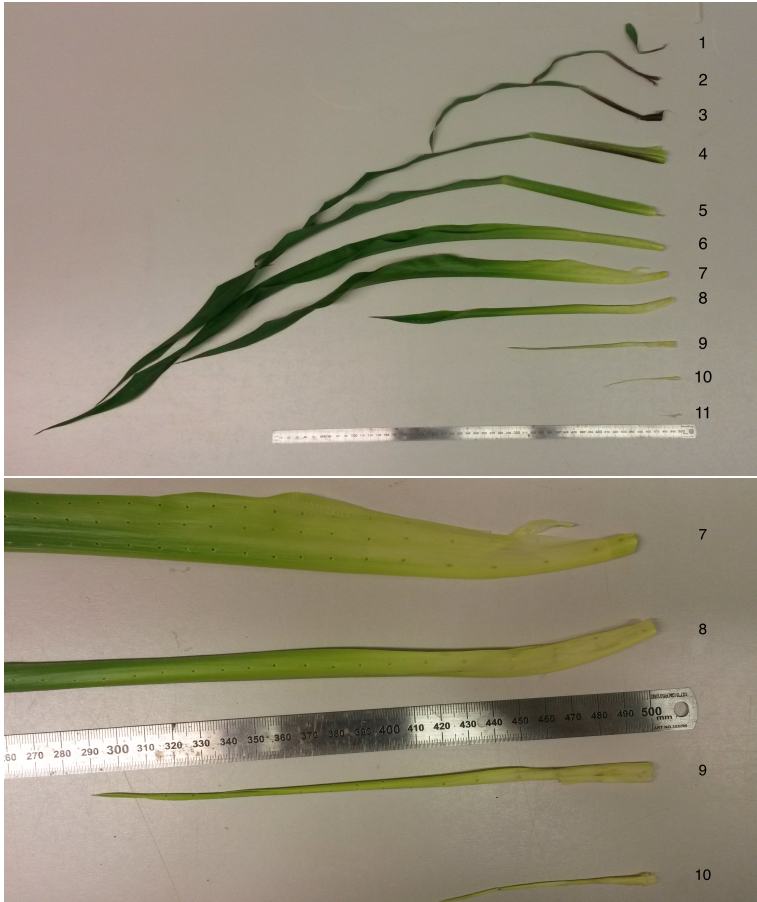


Abbildung 2.1: Pioneer 3906 nach 21 Tagen Wachstum und 24 h nach Perforation. Nummern bezeichnen Blätter chronologisch.

2.5 Physikalische Zellwandparameter

2.5.1 Extensibilität

Grundlagen

Ein Wachstum, welches als irreversible Volumenveränderung definiert ist (Heß 2008; Schopfer & Brennicke 2010), wird auf Zellebene durch die Größen der Extensibilität, des Turgors und des Turgorschwellenwertes beschrieben. Die vereinfachte Lockhart-Gleichung (Formel 2.3) beschreibt diese Größen in Abhängigkeit voneinander (Lockhart 1965).

$$dV/dt = m(\Psi_p - Y) \quad (2.3)$$

V: Volumenänderung; t: Zeit; m: Extensibilität; Ψ_p : Turgor; Y: Turgorschwellenwert

Die hier untersuchte Größe ist die Extensibilität der Zellwand. Ein Umstellen der Gleichung ergibt folgendes Bild (Formel 2.4):

$$m = \frac{dV/dt}{\Psi_p - Y} \quad (2.4)$$

m: Extensibilität; V: Volumenänderung; t: Zeit; Ψ_p : Turgor; Y: Turgorschwellenwert

Um die Extensibilität hinreichend genau bestimmen zu können, kann die Unbekannte des Turgors (Ψ_p) durch eine bekannte Kraft (F) ersetzt werden (Formel 2.5):

$$m = \frac{dV/dt}{F - Y} \quad (2.5)$$

m: Extensibilität; V: Volumenänderung; t: Zeit; F: Kraft; Y: Turgorschwellenwert

Wird nun eine definierte Kraft auf ein Gewebe ausgeübt, kann hieraus direkt an der Längen- änderung über die Zeit die Extensibilität abgeleitet werden.

2 Material und Methoden

Diese Annahme gilt jedoch nur, wenn die Anzahl der Zellwände im Querschnitt der gemessenen Gewebesegmente konstant ist. Der Turgorschwellenwert stellt eine weitere Unbekannte da, die in einem weiteren Experiment (Kap. 2.5.2) separat untersucht wurde. Die hier beschriebene Methode zur Messung der Extensibilität ermöglicht eine isolierte Messung beider Faktoren. Die Methode des „Wall-Creep-Measurement“ (Cosgrove 1989) nutzt diese Annahme als Grundlage. Die beschriebene Methode basiert auf dem „Shadowgraphic growth-recording apparatus“ nach Evans und Ray (1969). Der in dieser Arbeit entwickelte Apparat (Abb. 2.2) basiert auf der Version von Durachko und Cosgrove (2009).

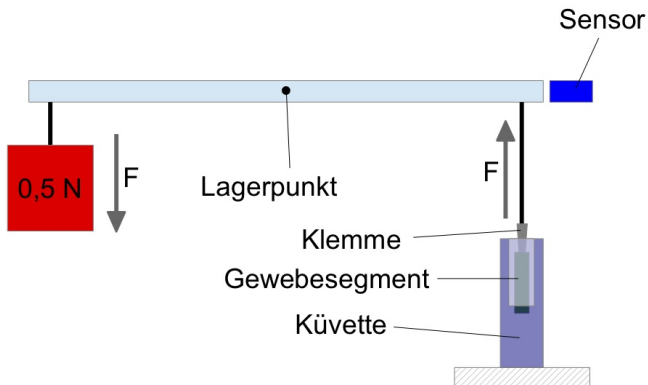


Abbildung 2.2: Schematischer Aufbau des neu entwickelten Extensometers

Ein Gewebesegment wird mit einer konstanten Zugkraft belastet und die Längenveränderung über die Zeit gemessen. Der beschriebene Aufbau besteht aus einer Küvette, in die ein Gewebesegment eingespannt wird. Über eine Klammer wird das Segment an eine Wippe angehängt, die auf der anderen Seite mit einem Gewicht belastet wird. Die Längenveränderung wird an einem Ende der Wippe mittels eines Linear-Transduktors abgenommen. Jedoch ist diese Methode auf Grund des verwendeten Linear-Transduktors sehr kosten-

intensiv. Um eine Kostenreduktion zu erwirken, mussten die Lineartransduktoren durch kostengünstigere Sensoren ersetzt werden. Die wichtigsten Eigenschaften sind eine Auflösung von mindestens 1 μm und ein Freibleiben der Messung von zusätzlichen Kräften. Die Wahl fiel auf lineare Hallensoren (Micronas HAL 815), welche die relative Position eines Magneten über die Stärke des Magnetfeldes erfassen können. Jedoch ist die Auflösung von 1024 Schritten bei einer gewöhnlichen Messanordnung auf einen Bereich von mehreren Zentimetern verteilt. Um dem entgegenzutreten zu können, wurde ein zweiter Magnet in Gegenpolung angeordnet. Hiermit konnte eine theoretisch unendliche Erhöhung der Auflösung erreicht werden, da nun eine Konzentration der Feldlinien auf engstem Raum bewirkt wurde. Die Magneten wurden in einem Abstand von einigen Millimetern angeordnet, was eine Auflösung von ca. 0,5 μm in einem Bereich von 450 μm ermöglichte. Der Hallensensor gibt ein analoges elektrisches Signal im Bereich von 0 bis 5 V aus, welches über eine Computerschnittstelle ausgewertet wurde. Hierfür wurde eine Software entwickelt (Entwicklungsumgebung: Profilab Expert 4.0), welche die elektrischen Signale in Längenveränderung/Zeit umsetzt. Die Kalibrierung des Hallensensors erfolgte über eine Bügelmessschraube, welche gleichzeitig zur Spannung der Apparatur genutzt wurde.

Messung

Zur Messung der Zellwandextensibilität wurden 0,5 cm breite und 2 cm lange Segmente aus dem zu untersuchenden Gewebe entnommen. Da in der Wachstumszone das Gewebe zu empfindlich für die Messapparatur ist, und keine stabile Messung erreicht werden konnte, wurden die Segmente direkt über der Wachstumszone entnommen. Gemessen wurde im Segment des zweitjüngsten Blattes, das direkt über dem Ansatz des letzten voll entwickelten Blattöhrchens entnommen wurde. Um einen störenden Einfluss der Blattadern zu vermeiden, wurden im 45° Winkel zu diesen die Segmente entnommen (Abb. 2.3). Um den störenden Einfluss des Turgors zu entfernen, wurden die so gewonnen Segmente in flüssigem Stickstoff schockgefrostet und vor der Messung wieder aufgetaut (Cramer *et al.* 2001). Zwischen Ernte und Messung wurden die Segmente bei -82°C gelagert.

2 Material und Methoden

Für die Messung wurde ein Segment in entionisiertem Wasser aufgetaut und in das Extensiometer eingespannt. Die Messküvette wurde mit entionisiertem Wasser befüllt, um ein Austrocknen des Gewebes zu verhindern. Nach dem Spannen der Apparatur wurde auf das Segment für 60 min eine Zugkraft von 0,05 N ausgeübt und die Längenveränderung gemessen. Die so erhaltene Kurve gliedert sich in eine exponentielle Phase, in der eine elastische Verformung des Gewebes eintritt. Im Anschluss hieran erfolgt der Übergang in eine lineare Phase, in der nur noch plastische Verformung auftritt, welche einen direkten Rückschluss auf die Extensibilität der Zellwand zulässt. Gegen den arbiträren Effekt der Streckung durch Zusammenfallen der Zellkörper bei den Blattsegmenten von Mais spricht, dass die plastische Längenveränderung nicht nur über einen kurzen Zeitraum, sondern über mehrere Stunden konstant war. Es wird vermutet, dass dieser Effekt in den ersten Minuten eintritt und als Teil der exponentiellen Phase sichtbar wird.

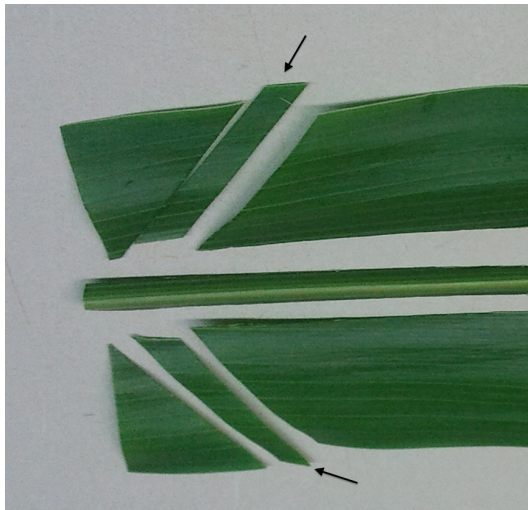


Abbildung 2.3: Schnittmuster zur Segmententnahme am zweitjüngsten Blatt. Die verwendeten Segmente werden durch Pfeile angezeigt.

Auswertung

Aus den so gewonnenen Messkurven wurde die plastische Verformung über 20 min abgeleitet. Die Extensibilität kann mit folgender Formel (2.6) beschrieben werden:

$$m = \frac{dL}{F \cdot dt} \quad (2.6)$$

m: Extensibilität ($\mu\text{m}/\text{N min}$); dL: Längenveränderung (μm); F: Kraft (N); dt: Zeitveränderung (min)

2.5.2 Turgorschwellenwert

Eine weitere Komponente der Lockart-Gleichung (2.3) stellt der Turgorschwellenwert dar. Um ein Wachstum der Zelle zu gewährleisten, muss dieser Schwellenwert vom Turgor übertroffen werden. Die Differenz zwischen Turgor und Turgorschwellenwert wird als wachstumswirksamer Turgor bezeichnet. Um den Turgorschwellenwert zu bestimmen, muss die erforderliche Kraft bestimmt werden, ab der eine plastische Verformung der Zellwand eintritt. Hierbei verhält sich die Zellwand wie ein Kelvin-Körper, zeigt also die typischen Eigenschaften eines viskoelastischen Festkörpers. Wichtig hierbei ist zu beachten, dass bei genügend langer Einwirkung einer Kraft nur die plastische Komponente der Verformbarkeit Einfluss auf den Messwert hat.

Die Messung wurde durch die Modifikation des Extensimeters realisiert. Hierzu wurde eine Pumpe installiert, welche computergesteuert die auf das Gewebe applizierte Kraft durch Hinzufügen von Wasser in den Gewichtsbehälter erhöhte. Die Kraft wurde erhöht, wenn für einen definierten Zeitraum keine Längenzunahme messbar war. War die Längenzunahme konstant, war der Turgorschwellenwert erreicht. Um den Turgorschwellenwert zu bestimmen, wurde die auf das Segment applizierte Kraft gravimetrisch ermittelt. Zur Computersteuerung wurde folgendes Programm genutzt:

2 Material und Methoden

Wenn $(m \leq 0) > 60 \text{ s}$ wird die Kraft erhöht bis $m > 0$

Wenn $(m > 0) > 30 \text{ min}$ dann ist $F \geq Y$ erreicht.

m: Extensibilität; Y: Turgorschwellenwert; F: Kraft

Die genutzten Zeiten wurden durch einen Vorversuch ermittelt. Wenn $(m \leq 0) > 60 \text{ s}$, kann davon ausgegangen werden, dass keine weitere Längenveränderung eintritt. Ist $(m > 0) > 30 \text{ min}$, so war in jedem Fall der Turgorschwellenwert überschritten und die Längenveränderung über mehrere Stunden konstant. Um zu verhindern, dass durch die elastische Verformung des gemessenen Gewebes der Turgorschwellenwert falsch positiv angenommen wurde, wurde die Zeitmessung für $(m > 0) > 30 \text{ min}$ erst nach der ersten Gewichtserhöhung gestartet.

2.6 Chemische Zellwandparameter

2.6.1 Zellwandextraktion

Die Extraktion der Zellwand wurde nach Goldberg (1985) modifiziert von Uddin *et al.* (2013) und Eitenmüller (2011) durchgeführt. Ziel war es, die reine Zellwand zu gewinnen und sonstige Zellkomponenten, insbesondere Kohlenhydratverbindungen, zu entfernen. Die Methode wurde durch Zugabe einer Iodlösung überprüft, welche etwaige aus dem Zellinhalt stammende Stärkereste dunkel verfärbt hätte. Hierfür wurden 25 g gefrorenes Frischmaterial in einen vorgekühlten 250 mL-Sorvall-Omnimixer-Becher (Waring Blender, Waring, New Hartford, Connecticut, USA) eingewogen und 80 mL 0,4 M gekühlte Saccharoselösung hinzugefügt. Wurde weniger Material eingesetzt, wurde dementsprechend mehr Saccharoselösung hinzugegeben. Das Material wurde in 24 Schritten zu je 30 s mit jeweils 5 min Pause auf Eis gemixt. Die Kühl Schritte waren nötig, um die Temperatur der Probe so niedrig wie möglich zu halten, dass die Enzymaktivität auf ein Minimum begrenzt wurde. Das so gewonnene Homogenisat wurde in einen 250 mL-Zentrifugenbecher überführt, auf 200 mL mit 0,4 M Saccharoselösung aufgefüllt und bei 700 g für

15 min zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstands wurde die Zentrifugation in 0,6 M und 1 M Saccharoselösung jeweils wiederholt. Das so gewonnene Pellet wurde mit 0,1%iger Triton-X-100 Lösung versetzt, für 1 min geschüttelt und bei 1000 g für 10 min zentrifugiert. Danach wurde das Material zur Fraktionierung über Nylonnetze gegeben und mit destilliertem Wasser so lange gespült, bis keine Blasenbildung auf Grund des Triton-X-100 mehr sichtbar war. Die Fraktion 250-405 µm wurde für die folgenden Analysen aufgefangen und gefriergetrocknet.

2.6.2 Cellulose

Die Bestimmung der Cellulosekonzentration in der Zellwand wurde mit einer Anthron-Methode durchgeführt (Updegraff 1969, Fry 2006, modifiziert von Uddin *et al.* 2013 und Eitenmüller 2011). Hierzu wurden in einem vorhergehenden Arbeitsschritt alle Polysaccharide entfernt, die nicht aus der Cellulose stammten.

Zur Entfernung störender Polysaccharide wurden 10 mg Zellwand eingewogen, mit 3 mL Essig-Salpetersäurereagenz (Essigsäure : Wasser : Salpetersäure = 8 : 2 : 1) versetzt und für 30 min im Wasserbad bei 100 °C erhitzt. Nach 5 min Abkühlen auf Eis wurden die Proben dreimal bei 2500 g zentrifugiert. Nach jeder Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und zuerst durch 10 mL H₂O und dann durch 10 mL Aceton ersetzt. Um Acetonreste zu entfernen, wurden die Proben vorsichtig mit Pressluft getrocknet.

Zur Bestimmung der Cellulosekonzentration wurde jede Probe mit 1 mL 67% H₂SO₄ versetzt und für 1 h bei 25 °C im Schüttelbad hydrolysiert. Nach der Hydrolyse wurde zu jeder Probe nochmals 1 mL 67% H₂SO₄ hinzugefügt. Um die Konzentration in der Messlösung in den für das Photometer linearen Bereich zu halten, wurden die Proben 1 : 5 verdünnt. Die Messlösung wurde aus 20 µL des verdünnten Hydrolysats, 480 µL H₂O und 1 mL eiskaltem Anthronreagenz hergestellt. Die Lösung wurde 5 min bei 100 °C im Wasserbad erwärmt und für 5 min auf Eis gekühlt. Nach der vollständigen Entwicklung des Farbkomplexes wurden die Proben bei 620 nm im Photometer gemessen.

Zur Erstellung einer Kalibriergerade wurde für 6 h bei 105 °C getrocknete, reine

2 Material und Methoden

Cellulose in 67% H₂SO₄ gelöst und eine Standardstammlösung mit der Konzentration 100 µg Cellulose/mL hergestellt. Der so erhaltene Standard wurde wie das verdünnte Hydrolysat behandelt.

2.6.3 Pectin

Die Bestimmung von Pectin wurde mit einer modifizierten Methode nach Filisetti-Cozi *et al.* (1991), modifiziert von Uddin *et al.* (2013) und Eitenmüller (2011) umgesetzt. Hierzu wurden 5 mg gefriergetrocknetes Zellwandmaterial eingewogen und auf Eis unter Rühren mit 1 mL konzentrierter Schwefelsäure versetzt. Nach jeweils 5 min erfolgte die Zugabe von 1 mL konzentrierter Schwefelsäure und zweimal 0,5 mL H₂O. Nach Auffüllen auf 10 mL Volumen mit H₂O und Zentrifugieren für 10 min bei 35.000 g wurden drei Reaktionsansätze mit jeweils 0,4 mL des Überstandes erstellt. Um Interferenzen durch Neutralzucker auszuschließen, wurden den Ansätzen jeweils 40 µL einer 4 M Kaliumsulfatatlösung zugesetzt. Nach dem Zugeben von 2,4 mL 75 mM Natriumtetraborat, gelöst in konzentrierter Schwefelsäure zur Verstärkung der Farbreaktion, wurden die Reaktionsansätze bei 100 °C im offenen Wasserbad erhitzt. Nach 20 min wurden die Reaktionsansätze für 10 min im Eisbad gekühlt. Zum Starten der Farbreaktion wurden in jeweils zwei Reaktionsansätzen 80 µL 0,5%ige m-Hydroxidiphenyl-Lösung und in den dritten Reaktionsansatz 0,5%ige NaOH-Lösung als Leerwert ohne Farbreaktion gegeben. Nach 5-10 min entwickelte sich ein rosa Farbkomplex, welcher bei 525 nm im Photometer gemessen werden konnte. Der Farbkomplex ist sehr instabil, was eine zeitlich gleiche Messung für alle Proben notwendig machte. Eine Kalibrierreihe wurde aus D-Galacturonsäure erstellt (Formel 2.7).

$$f = \frac{\sum m_{Standard}}{\sum Ext} \quad (2.7)$$

f : Kalibrierfaktor; m : Masse (µg); Ext : Extinktion

Die Berechnung der Konzentrationen erfolge durch Mittelwertbildung der gemessenen Extinktionen der beiden Reaktionsansätze und Abzug der gemessenen Extinktion des Leerwertes (Formel 2.8).

$$c \text{ (mg/mg)} = \text{Ext}_{\text{Probe}} - \text{Ext}_{\text{Leerwert}} \times f \times \left(\frac{10 \text{ mL}}{m_{\text{Probe}} \times 0,4 \text{ mL}} \right) \quad (2.8)$$

c : Konzentration (mg/g); Ext : Extinktion; f : Kalibrierfaktor (mg^{-1}); m :
Einwaage (g)

2.6.4 Methylierungsgrad des Pectins

Der Methylierungsgrad des Pectins wurde durch eine Verseifungsreaktion bestimmt, bei der die aus Pectin freigesetzte Menge an Methanol bestimmt wurde (Wood & Siddiqui 1971). Zur Verseifung wurden 5 mg Zellwand eingewogen, mit 1125 μL H_2O und 375 μL 1,5 M NaOH versetzt. Nach 30 min wurden die Proben im Eisbad für einige Minuten gekühlt, 375 μL 4,5 M H_2SO_4 hinzugefügt und im Eisbad belassen. Nach 10 min wurden die Proben für 5 min bei 0°C in einer Kühlzentrifuge bei 20.000 g zentrifugiert und 1 mL des Überstands in ein neues Reagenzglas überführt. Es wurde eine Standardreihe mit Methanol angesetzt. Zur Messung wurden 200 μL 2%ige KMnO_4 -Lösung hinzugefügt, für 15 min auf Eis gekühlt und 200 μL 0,5 M Na-Arsenit in 0,6 M H_2SO_4 hinzugegeben. Nach 60 min bei Raumtemperatur wurden 2 mL Farbreagenz hinzugegeben, bei 60°C erwärmt, nach 15 min in Eis abgekühlt und die Extinktion der Lösung bei 412 nm im Photometer gemessen. Durch Verrechnung mit der Pectinkonzentration lässt sich hieraus der Anteil der freien Carboxylgruppen im Pectin ermitteln. Das Farbreagenz wurde durch Lösen von 202 mg Acetylaceton in 100 mL 2 M Ammoniumacetatlösung hergestellt.

2.6.5 Hemicellulose

Die Bestimmung der Hemicellulose wurde mit einer HPAEC-PAD Methode (High Precision Anion Exchange Chromatography - Pulsed Amperometric Detection) nach vorhergehender Hydrolyse durchgeführt. Bei dieser Methode werden die Einfachzucker über eine Anionenaustauschersäule aufgetrennt (HPAEC) und mit Hilfe eines amperometrischen Detektors (PAD) nachgewiesen. Die Technik der gepulsten amperometrischen Detektion basiert auf einer

2 Material und Methoden

Oxidation der Analytmoleküle bei hohem pH-Wert auf einer Gold-Arbeits-
elektrode. Hierdurch akkumulieren die Substanzen auf der Elektrode, welche hier-
durch „vergiftet“ wird. Um diesen Vorgang zu unterbinden, wird das elektrische
Feld in kurzen zeitlichen Abständen von einigen 100 ms umgepolt, um die ak-
kumulierten Moleküle von der Elektrodenoberfläche abzustoßen und wieder
eine erneute Messung durchführen zu können (Schwedt & Vogt 2010).

Die Hemicellulose in den Proben wurde durch Hydrolyse mit Schwefelsäure in
ihre Bestandteile aufgeschlossen (Willför *et al.* 2009; Uddin *et al.* 2013). Das
Hydrolysat konnte nach Verdünnung direkt eingesetzt werden. Hierfür wur-
den 10 mg gefriergetrocknetes Zellwandmaterial eingewogen, mit 200 μL 72%
 H_2SO_4 versetzt und bei 30 °C für 60 min inkubiert. Das Hydrolysat wurde mit
5,6 mL H_2O versetzt und bei 120 °C für 60 min im Autoclaven inkubiert. Nach
Auffüllen auf 50 mL mit H_2O wurde die Analysenlösung durch 0,45 μm PTFE-
Filter filtriert.

Von diesem Filtrat wurden 10 μL über eine Carbo Pac PA10 Säule der Fir-
ma Dionex (Sunnyvale, California, USA) mit 0,2 mM NaOH als Eluent bei ei-
ner Flussrate von 0,25 mL/min aufgetrennt. Die Detektion erfolgte durch eine
Goldarbeitselektrode mit Pulsung folgender Art:

Stabilisierung (0,1 V, 0,2 s) → Messung (0,1 V, 0,2 s) →
Regeneration (-2 V, 0,1 s)

Nach Beendigung der Messung einer Probe wurde die Säule mit
200 mM NaOH gespült, um mögliche Verunreinigungen vor der nächsten Mes-
sung zu entfernen.

Es wurde jeweils eine Kalibrierreihe aus Arabinose, Rhamnose, Galactose,
Glucose, Xylose und Mannose erstellt.

Die Berechnung der Konzentrationen erfolgte nach folgender Formel (Formel
2.9):

2.6 Chemische Zellwandparameter

$$c_{\text{Zucker}ZW} = c_{\text{Zucker}}/c_{ZW} = c_{\text{Zucker}}/0,2 \quad (2.9)$$

$c_{\text{Zucker}ZW}$: Konzentration der Zucker in der Zellwand (mg/g);

c_{Zucker} : Konzentration der Zucker in der Analysenlösung (mg/L);

c_{ZW} : Zellwandeinwaage in die Analysenlösung (g/L)

Um den Einfluss der in dieser Methode mit erfassten Cellulose zu eliminieren, wurde die bereits mit der Anthron-Methode (Kap. 2.6.3) ermittelte Cellulosekonzentration jeweils von dem Ergebnis der Hemicellulosebestimmung subtrahiert. Da die Ergebnisse der Anthron-Methode mit denen der HPAEC-PAD übereinstimmten (Abb. 2.4), konnte eine Bestimmung von Glucose in der Hemicellulose mit dieser Methode nicht durchgeführt werden. Ferner eignet sich auf Grund dieser Ergebnisse die Nutzung der HPAEC-Methode zur Bestimmung der Konzentration der Hemicellulose-Monomere und der Cellulosekonzentration in einem Schritt.

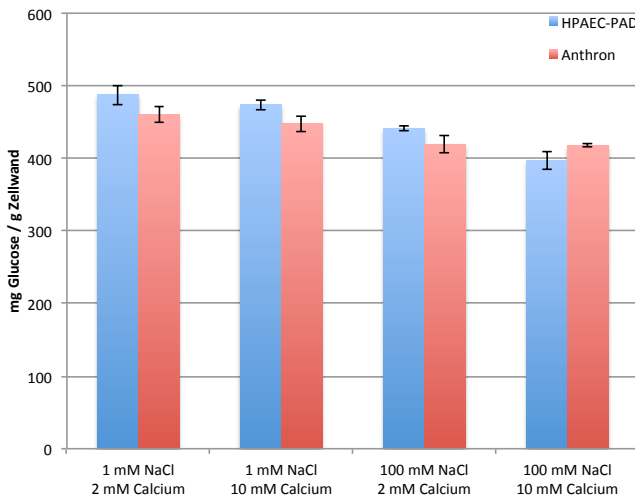


Abbildung 2.4: Glucosekonzentration in der Zellwand, nach 21 Tagen Wachstum mit 7 Tagen 1 mM bzw. 100 mM NaCl Salzstress, ermittelt mit der Anthron- und der HPAEC-PAD-Methode.

2.6.6 Ansäuerung des Apoplasten

Zur Messung des apoplastischen pH-Wertes wurde eine fluoreszenzmikroskopische Methode, wie bei Pitann *et al.* (2009) beschrieben, verwendet. Die Blattsegmententnahme wurde am zweitjüngsten Blatt, direkt über dem letzten voll entwickelten Blattöhrchen, durchgeführt.

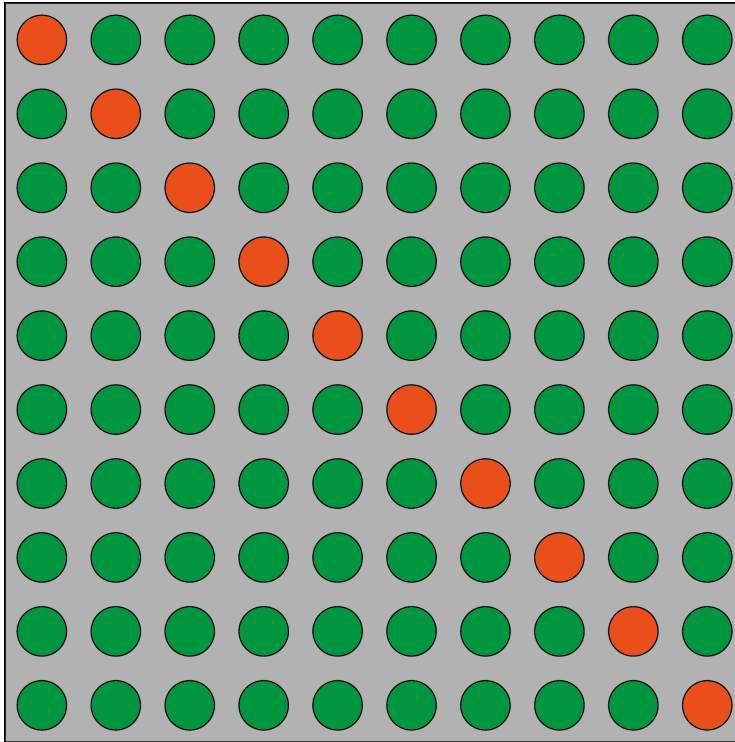
2.7 Kationenanalyse

Zur Analyse der Kationen in Pflanzenmaterial wurde die Atomabsorptionsspektrometrie (AAS) eingesetzt. Hierfür wurden 500 mg getrocknetes und gemahltes Pflanzenmaterial in einen Porzellantiegel eingewogen und bei 550 °C verascht. Der Glührückstand wurde mit 2 mL bidest. Wasser aufgenommen und mit 5 mL 5 M HNO₃ versetzt. Die Aschelösung wurde bis zum beginnenden Sieden erwärmt und durch einen Weißbandfilter in einen 100 mL-Messkolben mit bidest. Wasser überspült. Die so gewonnene Analysenlösung wurde mit einem Atomabsorptionsspektrometer (SpectrAA 220FS, Varian, Palo Alto, California, USA) hinsichtlich ihrer Konzentration von Calcium, Kalium, Natrium und Magnesium untersucht (Steffens & Schubert 2004).

2.8 Screening

Die Anzucht für das Screening wurde nach folgendem zeitlichem Schema durchgeführt:

- Quellen des Saatguts in 1 mM CaSO_4 -Lösung über Nacht
- Tag 1: Überführen der Körner in Sandwichkultur mit 1 mM CaSO_4 -Lösung, abgedunkelt in der Klimakammer
- Tag 3: Belichten der Sandwichkultur
- Tag 6: Einsetzen der gekeimten Pflanzen in $\frac{1}{4}$ konzentrierte Nährlösung
- Tag 8: Erhöhen auf $\frac{1}{2}$ konzentrierte Nährlösung
- Tag 10: Erhöhen auf die volle Nährlösungskonzentration
- Tag 13: Applikation von 25 mM NaCl in der Behandlung und Wechsel der Nährlösung
- Tag 14: Erhöhen der NaCl-Konzentration auf 50 mM
- Tag 15: Erhöhen der NaCl-Konzentration auf 75 mM
- Tag 16: Erhöhen der NaCl-Konzentration auf 100 mM und Wechsel der Nährlösung
- Tag 17: Erhöhen der NaCl-Konzentration auf 125 mM
- Tag 18: Erhöhen der NaCl-Konzentration auf 150 mM
- Tag 20: Bestimmung der Blattlängen und Nährlösungswechsel
- Tag 22: Nährlösungswechsel
- Tag 24: Bestimmung der Blattlängen und Selektion



 Screeningpflanzen  Einfachhybride als Umweltkontrolle

Abbildung 2.5: Pflanzenbesatz der Screeningbehälter

Hierbei wurden bei jedem Durchgang 90 Pflanzen gescreent und 9 Pflanzen einer uniformen Hybride als Umweltkontrolle mitgeführt. Es wurde die Standardnährlösung ohne Silizium verwendet (Kap. 2.2.4). Die Verteilung der Pflanzen im Gefäß erfolgte nach Abbildung 2.5. Am 24. Tag wurden die Pflanzen auf Grund ihrer prozentualen Blattlängenzunahme vom 20. auf den 24. Tag selektiert. Pflanzen, welche Symptome der zweiten Phase des Salzstresses oder andere Defekte aufzeigten, wurden nicht weitergeführt.

2.9 Extensibilität der Zellwand verschiedener Genotypen unter Salzstress

2.9.1 Pflanzenanzucht

Die Anzucht der Genotypen Pioneer 3906 (cv. Ornella), SR 03, SWS X, SWS 47, SWS 164 und NaExII (I8) wurde in der Klimakammer nach dem Schema für Standard-Anzucht mit 100 mM Salzstress mit jeweils 4 Pflanzen in 4,5 L Gefäßen mit 4 Litern Nährlösung durchgeführt (Kap. 2.2.2). Es wurden jeweils 4 Wiederholungen mit 1 mM NaCl und 100 mM NaCl für jeden Genotyp angesetzt.

2.9.2 Untersuchte Parameter

Am 20. Tag wurden die Blattlängen der Pflanzen ermittelt (Kap. 2.3.1). Bei der Ernte wurden Frisch- und Trockenmassen erfasst (Kap. 2.3.3) und Segmente zur Messung der Zellwandextensibilität entnommen (Kap. 2.5.1).

2.10 DSR-Hybriden in der ersten Phase des Salzstresses

2.10.1 Pflanzenanzucht

Die Anzucht der Genotypen Pioneer 3906, DSR 3 und DSR 5 wurde in der Klimakammer nach der Standard-Anzucht mit 150 mM Salzstress (Kap. 2.2.3 mit jeweils 4 Pflanzen in 4,5 L Gefäßen mit 4 Litern Nährlösung durchgeführt. Es wurden jeweils 4 Wiederholungen mit 1 mM NaCl und 150 mM NaCl für jeden Genotyp angesetzt.

2.10.2 **Untersuchte Parameter**

Die Blattflächen wurden am 19. und 21. Tag erfasst und hieraus die Blattflächenzunahmerate berechnet (Kap. 2.3.1). Am Tag der Ernte wurden die Frischmassen von Spross und Wurzel erfasst (Kap. 2.3.3). Aus dem zweitjüngsten Blatt jeder Pflanze wurden Gewebesegmente für die Extensiometermessungen entnommen (Kap. 2.5.1, Abb. 2.3). Aus den Pflanzen wurde jeweils die Wachstumszone herauspräpariert (Kap. 2.4), in flüssigem Stickstoff eingefroren und zur späteren Analyse bei -82°C gelagert.

Aus der Wachstumszone wurde die Zellwand extrahiert und Cellulose, Hemicellulose, Pectin und der Methylierungsgrad des Pectins bestimmt (Kap. 2.6).

2.11 **DSR-Hybriden in der zweiten Phase des Salzstresses**

2.11.1 **Pflanzenanzucht**

Die Anzucht der Genotypen Pioneer 3906, DSR 3 und DSR 5 wurde in der Klimakammer nach der Standard-Anzucht mit 150 mM Salzstress (Kap. 2.2.3) mit jeweils 8 Pflanzen in 11 L Gefäßen mit 8 Litern Nährlösung durchgeführt. Es wurden jeweils 4 Wiederholungen mit 1 mM NaCl und 150 mM NaCl für jeden Genotyp angesetzt.

2.11.2 **Untersuchte Parameter**

Untersucht wurden die Parameter Frisch- und Trockenmasse (Kap. 2.3.3) und die Kationenkonzentrationen (Calcium, Kalium, Magnesium, Natrium) in Spross und Wurzel. Die Kationenkonzentrationen wurden mit der Atomabsorptionsspektrometrie (Kap. 2.7) ermittelt.

2.12 Einfluss der Calciumkonzentration unter Salzstress der ersten Phase

Zur Untersuchung des Einflusses der Calciumkonzentration unter Salzstress wurde ein Experiment mit dem Genotypen Pioneer 3906 angesetzt. Hierbei wurden vier Varianten (Tab. 2.4) in 4facher Wiederholung nach dem Standardanzuchtplan für 100 mM NaCl angesetzt (2.2.2).

Tabelle 2.4: Varianten der Calcium- und NaCl-Konzentrationen

1.	1 mM NaCl	2 mM Ca ²⁺
2.	1 mM NaCl	10 mM Ca ²⁺
3.	100 mM NaCl	2 mM Ca ²⁺
4.	100 mM NaCl	10 mM Ca ²⁺

Zur Verwendung kam eine modifizierte Nährlösung für Maisanzucht (Tab. 2.5). In den Calcium-Kontrollvarianten wurden 10 mM CaCl₂ und in den Calcium-Mangelvarianten 2 mM CaCl₂ zugegeben. Ab dem 14. Tag wurde Calciumnitrat durch Kaliumnitrat ersetzt. Die hierdurch erhöhte Kaliumkonzentration wurde durch Weglassen von Kaliumsulfat ausgeglichen (Tab. 2.6). Die Entscheidung hierfür wurde erst am 14. Tag getroffen, wodurch 3 Tage die volle Nährlösungskonzentration mit 4 mM Calcium in den Mangelvarianten und 12 mM Calcium in den Kontrollvarianten gegeben wurde.

Tabelle 2.5: Zusammensetzung der Nährlösung bis zum 14. Tag

Substanz	Konzentration (mM)	Substanz	Konzentration (μM)
Ca ₂ (NO ₃) ₂	2,0	MnSO ₄	2,0
K ₂ SO ₄	1,0	ZnSO ₄	0,5
MgSO ₄	0,75	CuSO ₄	0,3
KH ₂ PO ₄	0,2	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄	0,01
Na ₂ SiO ₃	1,0	NiSO ₄	0,1
		Fe-EDTA	0,2

Tabelle 2.6: Zusammensetzung der Nährlösung ab dem 14. Tag

Substanz	Konzentration (mM)	Substanz	Konzentration (μM)
KNO_3	4,0	MnSO_4	2,0
MgSO_4	0,75	ZnSO_4	0,5
KH_2PO_4	0,2	CuSO_4	0,3
Na_2SiO_3	1,0	$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$	0,01
		NiSO_4	0,1
		Fe-EDTA	0,2

2.12.1 Untersuchte Parameter

Bei der Ernte wurden die Spross- und Wurzelfrischmassen (Kap. 2.3.3) erfasst. Aus dem zweitjüngsten Blatt wurden jeweils Segmente zur Bestimmung der Extensibilität entnommen (Kap. 2.5.1). Zur Untersuchung der chemischen Zellwandparameter wurde die Pflanze durch Schnitt über dem letzten voll entwickelten Blattöhrchen in jungen und alten Spross geteilt. Zum jungen Spross wurden nur die Blätter ohne Blattöhrchen gezählt. Die Zellwandextraktion wurde nur mit dem Material des jungen Sprosses durchgeführt.

In der so gewonnenen Zellwand wurden die Konzentrationen von Cellulose, Pectin, freien Carboxylgruppen des Pectins und die Zusammensetzung Hemicellulose ermittelt (Kap. 2.6).

2.13 Zellteilung unter Salzstress

Zur Untersuchung der Zellteilung unter Salzstress wurde ein Experiment mit dem Genotypen Pioneer 3906 angesetzt. Die Anzucht erfolgte in der Klimakammer nach dem Standardanzuchtplan mit 150 mM NaCl (Kap. 2.2.3). Als Maß für die Anzahl der Zellen je Spross wurde der DNA-Gehalt ermittelt. Zur Messung des Zellvolumens wurde die DNA-Konzentration herangezogen, welche ein Maß für die Zellzahl/Frischmasse darstellt. Um das Zellvolumen zu erhalten, wird die Masse mit dem Volumen gleichgesetzt. Der Kehrwert aus Zellzahl/Zellvolumen ergibt somit das Volumen/Zelle.

$$\frac{Z}{FM} = \frac{m_{DNA}}{FM} \quad (2.10)$$

Z: Anzahl Zellen; FM: Frischmasse (g); m_{DNA} : DNA (mg)

$$V_{Zelle} = \frac{1}{Z} \quad (2.11)$$

V_{Zelle} : Volumen der Zelle; Z: Anzahl Zellen

Hierfür wurde jeweils der Spross einer Pflanze in flüssigem Stickstoff fein gemörsert. Die DNA wurde mit dem DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen Venlo, Niederlande) extrahiert. Hierfür wurden 100 mg des gemörserten Materials eingewogen und dem Quick-StartProtocol (April 2012) folgend vorgegangen, wobei die Inkubationszeit für den Puffer AP1 mit RNAse auf 15 min verlängert wurde. Die DNA-Konzentration wurde mit einem Nanodrop (Modell: ND-1000, Peqlab, Erlangen) bestimmt und der DNA-Gehalt je Spross errechnet.

2.13.1 Berechnung des Zellvolumens aus der Extensibilität der Zellwand

Aus einer Veränderung der Extensibilität kann auf eine Veränderung der Zellgröße geschlossen werden. Ein direkter Rückschluss von Extensibilität auf das Volumen ist jedoch nicht möglich, da die gemessene Extensibilität einen eindimensionalen Faktor darstellt und das Zellvolumen dreidimensional ist. Für die Umrechnung der Veränderung der Extensibilität, in eine Veränderung der Zellgröße, kann eine Pflanzenzelle als Zylinder angenommen werden und so das Volumen berechnet werden (2.12). Zum einfacheren Verständnis wurde nicht der Radius, sondern der Durchmesser des Zylinders genutzt ($r^2 = \frac{d^2}{4}$).

$$V = \pi \cdot \frac{d^2}{4} \cdot h \quad (2.12)$$

V: Volumen; d: Durchmesser des Zylinders; h: Höhe des Zylinders

Das Verhältnis einer Größenänderung kann auch ohne Kenntnis der absoluten Zellgröße errechnet werden (2.13). Das Verhältnis von d zu h ist für das Verhältnis der Zellvolumina unerheblich, da die Extensibilität auf beide Faktoren gleichermaßen wirkt und eine Konstante darstellt. Dies kann leicht durch Einsetzen und Umformen der Gleichung gezeigt werden (2.14).

$$\frac{dV_2}{dV_1} = \left(\frac{\pi (d \frac{Ext_2}{Ext_1})^2 h \frac{Ext_2}{Ext_1}}{4} \right) / \left(\frac{\pi (d)^2 h}{4} \right) \quad (2.13)$$

$$\frac{dV_2}{dV_1} = \left(\frac{Ext_2}{Ext_1} \right)^3 \quad (2.14)$$

V: Zellvolumen; d: Durchmesser der Zelle; h: Höhe der Zelle; Ext: Extensibilität der Zellwand

2.14 Züchtung

2.14.1 Grundlagen

Zur Verbesserung der Resistenz in der ersten Phase des Salzstress wurden Erkenntnisse aus den salzresistenten SR-Hybriden herangezogen. Unter Salzstress der ersten Phase zeigt die empfindliche Maishybride Pioneer 3906 eine verminderte Ansäuerung des Apoplasten, die salzresistente Hybride SR 03 erhält diese jedoch aufrecht (Pitann *et al.* 2009). Die ähnlich salzresistente Hybride SR 12 zeigt unter Salzstress der ersten Phase ebenso wie Pioneer 3906 eine verminderte Ansäuerung des Apoplasten (Hatzig *et al.* 2010), einhergehend mit einer Erhöhung der Arabinosekonzentration in der Zellwand (Eitenmüller 2011; Uddin *et al.* 2014). Das Zuchtziel ist eine Verbesserung der Resistenz in der ersten Phase des Salzstress zu erreichen, indem die Eigenschaften der apoplastischen Ansäuerung und der Erhöhung der Arabinosekonzentration in einer Linie vereint werden.

2.14.2 Erstellung von Inzuchtlinien

Die Erstellung von Inzuchtlinien ist ein zeit- und arbeitsaufwändiger Prozess. Um eine ausreichend homozygote, stabile Inzuchtlinie aus einer heterozygoten F₂ Population zu erhalten, müssen über 7 Generationen wiederholte Selbstungen und Selektionen durchgeführt werden. Durch die wiederholte Selektion in jeder Selbstungsgeneration wird eine Aufkonzentration von erwünschten Genen erreicht. Angestrebt wird ein Inzucht-Koeffizient von 0,992,

was je nach vorhandenen Ressourcen einen Zeitaufwand von 3-6 Jahren bedeutet (Hallauer 2009). Als Alternative zur Selbstung und rekurrenten Selektion bietet sich die Erstellung von doppelhaploiden Pflanzen an. Hierdurch kann die Zeit zur Erstellung einer Inzuchtlinie auf ein Jahr verkürzt werden. Durch die Verdopplung des haploiden Chromosomensatzes eines Gameten wird eine homozygote Pflanze erhalten, welche direkt als Linie in der weiteren Zucht verwendet werden kann. Zur Erstellung von doppelhaploiden Genotypen bestehen mehrere Verfahren die im Folgenden dargestellt werden sollen.

2.14.3 Erstellung von doppelhaploiden Pflanzen

In vitro-Technik

Die In vitro-Technik zeichnet sich durch das Verwenden von Zellkulturmethoden aus. Hierbei werden aus einer Donorpflanze Keimzellen oder Pollen entnommen, welche auf einem Nährmedium zu einem haploiden Embryo regeneriert werden. Mais ist jedoch eine Pflanzenart, welche nur sehr schwer mittels Gewebekultur zu bearbeiten ist. Die Möglichkeit, Antheren oder Mikrosporen auf einem Nährmedium zu kultivieren, ist sehr stark abhängig vom Genotyp der Donorpflanze (Geiger 2009).

In vivo-Technik

In vivo-Methoden werden direkt auf den Pflanzen umgesetzt. Hierbei wird eine Donorpflanze mit einer Inducerpflanze gekreuzt. Diese Kreuzung führt zu haploidem Saatgut. Hierbei bestehen zwei Möglichkeiten. Zum einen die Induktion von paternalen Haploiden und zum anderen die Induktion von maternalen Haploiden. Zur Induktion paternaler Haploider wird eine Inducerpflanze mit Pollen der Donorpflanze bestäubt. Die Inducerpflanze bildet infolgedessen Körner aus, welche im Embryo den haploiden Chromosomensatz der Donorpflanze enthalten. Die Induktion beruht auf dem Merkmal der Mutante „indeterminate gametophyte“, welches durch das rezessive *ig*-Gen kontrolliert wird. Pflanzen, die in Bezug auf dieses Merkmal homozygot sind, weisen hohe Raten von Embryomissbildungen auf, wodurch Induktionsraten von maximal 1-2% zu erreichen sind.

Zur Induktion von maternalen Haploiden wird die Donorpflanze mit dem Pollen des Inducers bestäubt. Hierdurch bildet die Donorpflanze haploide Samenkörner aus. Die aktuellen Erfolgsraten liegen bei 8-10% mit der Inducerlinie RWS aus Stuttgart, Hohenheim. Der Mechanismus, der die Bildung haploider Samen auf der Mutterpflanze bewirkt, ist bisher ungeklärt, jedoch scheint es sehr wahrscheinlich, dass eine der beiden Spermazellen des Maispollens der Inducerpflanzen einen Defekt aufweist, der dazu führt, dass die väterlichen Chromosomen in den ersten Zellteilungen des Embryos degenerieren und somit eliminiert werden. Ein Hinweis auf diesen Mechanismus ist die Tatsache, dass die so gewonnenen haploiden Pflanzen keine Merkmale des Inducers ausbilden (Geiger 2009).

2.14.4 Künstliche Verdopplung des Chromosomensatzes

Haploide Maispflanzen sind in den meisten Fällen männlich steril und bilden keine Antheren in ihren Rispen, während die weiblichen Geschlechtsorgane weiterhin fruchtbar ausgebildet werden. Eine Selbstung ist somit auf Grund des fehlenden Pollen nicht möglich (Chalyk 1994). Um haploide Maispflanzen selbst zu können, muss ihr Chromosomensatz verdoppelt werden, was zu einer Wiederherstellung der männlichen Fertilität führt. Unter gewissen Umständen verdoppeln haploide Maispflanzen spontan ihren Chromosomensatz, jedoch ist diese Art der Verdopplung stark abhängig vom Genotyp und zeichnet sich nicht durch hohe Erfolgsraten aus (Deimling *et al.* 1997). Um die Verdopplungsraten des Chromosomensatzes zu erhöhen, stehen vielfältige Methoden zur Verfügung. Als einfachste und gleichzeitig effektivste Methode hat sich die Behandlung mit dem Gift der Herbstzeitlosen (*Colchicum autumnale*), dem Colchicin, erwiesen. Colchicin wirkt als Spindelgift und verhindert somit die Ausbildung des Spindelapparates in der Mitose. Hierdurch wird das Aufteilen der Chromosomen auf die neu entstehenden Zellen unterbunden, was zu einer Verdopplung des Chromosomensatzes führt.

2.15 Erstellung von Doppelhaploiden

2.15.1 Erstellung von Haploiden

Zur Erstellung von Doppelhaploiden wurden die Mutterlinien von SR 03 und SR 12, SWS 47 und SWS 164 gekreuzt. Hierbei wurde SWS 164 als Mutter und SWS 47 als Vater gewählt. Von der so erstellten Hybride wurden in Chile 200 Pflanzen mit Pollen von Donorpflanzen (UH800) bestäubt (Rotarencó *et al.* 2009) und die so gewonnen Körner anhand einer Farbmarkierung selektiert (Geiger 2009) (Abb. 2.6). Alle nicht haploiden Körner wurden verworfen.

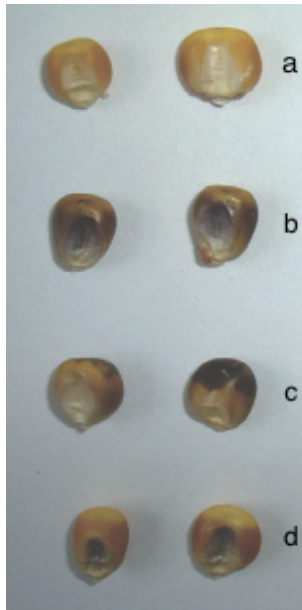


Abbildung 2.6: Körner aus der Kreuzung (SWS 164 \times SWS 47) \times UH800

- a) Krone und Scutellum farblos: Ausgekreuzt oder geselbstet
- b) Krone und Scutellum gefärbt: F₁-Hybride
- c) Krone gefärbt, Scutellum farblos: Haploid
- d) Krone farblos, Scutellum gefärbt: Embryo letal

2.15.2 Verdopplung des Chromosomensatzes

Die haploiden Körner wurden mittels einer modifizierten Methode nach Deimling *et al.* (1997) behandelt. Hierzu wurden die Körner bei 24 °C in Keimschalen auf mit 1 mM CaSO₄ getränktem Filterpapier unter gelochter Alufolie für ca. 4 Tage vorgekeimt, bis die Koleoptile ca. 1 cm lang war. Einem Pilzbefall wurde durch Behandlung mit Benomyl (1 g in 5 L Wasser) vorgebeugt. Um eine bessere Wirkungsweise des Colchicins zu gewährleisten, wurde durch Entfernen der Koleoptilspitze das Apikalmeristem freigelegt. Weiterhin wurden die Wurzeln auf 20-30 mm eingekürzt. Die so behandelten Keimlinge wurden für 12 h bei 18 °C in eine Lösung mit 0,06% Colchicin und 0,5% DMSO getaucht. In diese Lösung wurde zusätzlich 1 mM CaSO₄ gegeben, um die Membranstabilität der Zellen zu unterstützen. Nach der Einwirkzeit der Colchicininlösung wurden die Keimlinge fünfmal unter fließendem Wasser gespült, in Torfkultursubstrat mit 1/4 Quarzsand eingesetzt und zur Erhöhung der Luftfeuchtigkeit die ersten Tage abgedeckt (Geiger 2009). Nach 14 Tagen wurden die so behandelten Keimlinge in Freilandkultur ausgepflanzt und geselbstet. Pflanzen, die sich auf Grund ihres Wachstums oder ihrer Färbung als diploid erwiesen, wurden entfernt.

2.15.3 Selektion

Das doppelhaploide Saatgut wurde einem Screening auf Salzresistenz unterzogen (Kap. 2.8). Hierbei wurden die besten 20 Genotypen selektiert und zur Saatgutvermehrung geselbstet. Die so erstellten Doppelhaploiden Linien (DH) können für Kreuzungen verwendet werden.

2.15.4 Erstellung der DSR-Hybriden

Zur Erstellung der neuen DSR-Hybriden (Doppelhaploide Salzresistente), wurden die DH-Linien mit NaExII gekreuzt.

2.16 Statistik

Zur statistischen Auswertung wurden Microsoft Excel for Mac 2011 (t-Test) und IBM SPSS 22 (ANOVA mit Tukeytest) genutzt. Signifikante Unterschiede bei der Verwendung des t-Tests werden mit Sternchen angezeigt. Bei der ANOVA zeigen unterschiedliche Buchstaben signifikant verschiedene Varianten.

3 Ergebnisse

3.1 Versuch 1 - Ansäuerung des Apoplasten

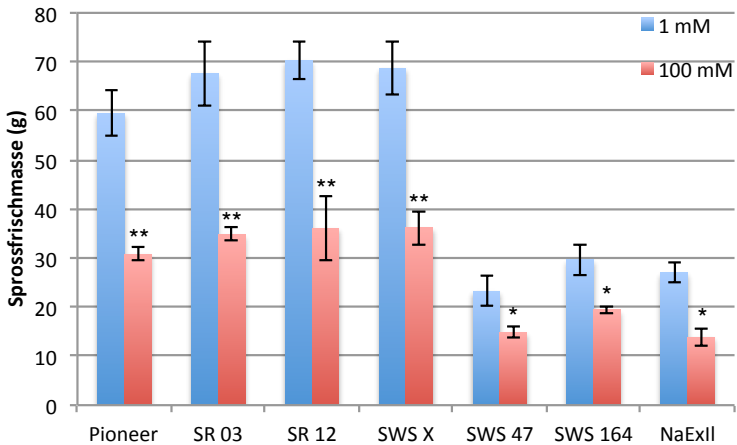


Abbildung 3.1: Einfluss von Salzstress auf die Sprossfrischmassen verschiedener Genotypen nach 21 Tagen Wachstum mit 7 Tagen 1 mM bzw. 100 mM NaCl.
t-Test: * $p \leq 5\%$ ** $p \leq 1\%$

Die Sprossfrischmassen wurden in der ersten Phase des Salzstress bei allen Genotypen unter Salzstress signifikant reduziert. Die Linien SWS 47 und SWS 164 zeigten eine signifikante Reduktion auf dem Niveau von $p \leq 5\%$, während die Hybriden eine signifikante Reduktion auf dem Niveau $p \leq 1\%$ zeigten. Die Sprossfrischmassen der Linien fielen deutlich kleiner aus, als die der Hybriden.

3.1 Versuch 1 - Ansäuerung des Apoplasten

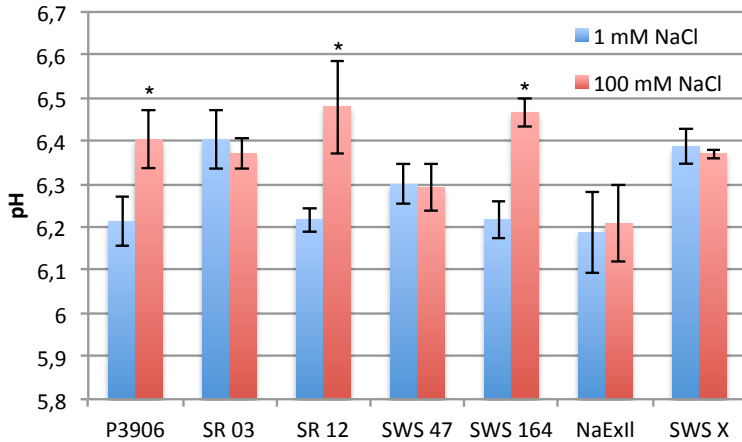


Abbildung 3.2: Einfluss von Salzstress auf den apoplastischen pH-Wert verschiedener Genotypen nach 21 Tagen Wachstum mit 7 Tagen 1 mM bzw. 100 mM NaCl.
t-Test: * $p \leq 5\%$

Salzstress beeinflusste den apoplastischen pH-Wert verschiedener Genotypen unterschiedlich. Die Genotypen Pioneer 3906, SR 12 und SWS 164 (Mutterlinie von SR 12) reagierten mit einer Erhöhung des apoplastischen pH-Wertes auf die erste Phase des Salzstress. Die Genotypen SR 03, SWS 47 (Mutterlinie von SR 03), NaExII (Vaterlinie von SR 03 und SR 12) und SWS X (Kreuzung SWS 47 x SWS 164) hielten unter Salzstress die Ansäuerung des Apoplasten aufrecht.

3.2 Versuch 2 - Extensibilität der Zellwand

3.2.1 Wachstumsparameter

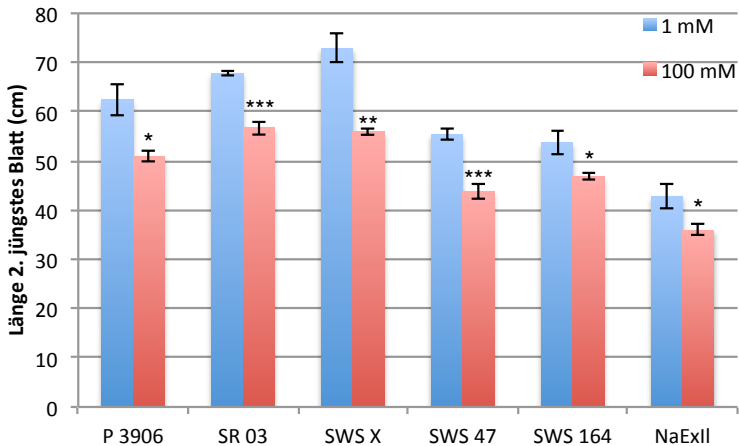


Abbildung 3.3: Einfluss von Salzstress auf die Länge des zweitjüngsten Blattes verschiedener Genotypen nach 20 Tagen Wachstum mit 7 Tagen 1 mM bzw. 100 mM NaCl.
t-Test vs. Pioneer 3906: * $p \leq 5\%$ ** $p \leq 1\%$ *** $p \leq 0,05\%$

Die Länge des zweitjüngsten Blattes, an welchem die Extensiomermessung vorgenommen wurde, war bei allen Genotypen unter Salzstress signifikant vermindert. Die Genotypen Pioneer 3906, SWS 164 und NaExII zeigten eine signifikante Reduktion der Blattlänge auf dem Niveau $p \leq 5\%$, der Genotyp SWS X auf dem Niveau $p \leq 1\%$ und die Genotypen SR 03 und SWS 47 auf dem Niveau von $p \leq 0,05\%$.

3.2 Versuch 2 - Extensibilität der Zellwand

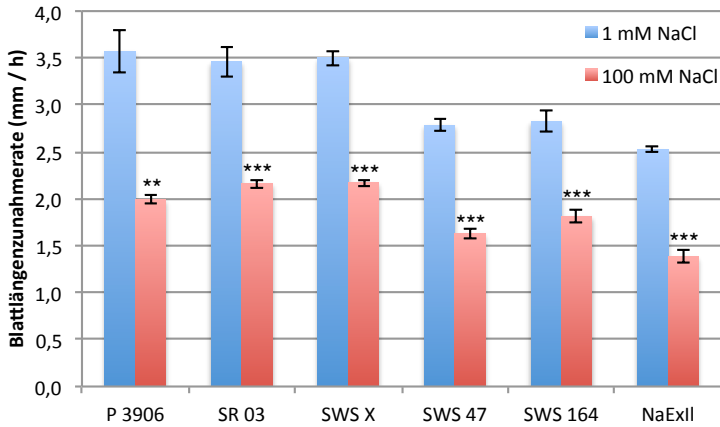


Abbildung 3.4: Einfluss von Salzstress auf die Blattlängenzunahmerate verschiedener Genotypen vom 18. auf den 20. Tag des Wachstums mit 4 bzw. 6 Tagen 1 mM bzw. 100 mM NaCl.
t-Test: ** $p \leq 1\%$ *** $p \leq 0,05\%$

Die Blattlängenzuwachsraten waren bei den Genotypen SR 03, SWS X, SWS 47, SWS 164 und NaExII signifikant reduziert auf dem Niveau $p \leq 0,05\%$. Bei Pioneer 3906 war ebenso eine signifikante Reduktion zu verzeichnen, jedoch auf dem Niveau $p \leq 1\%$.

3 Ergebnisse

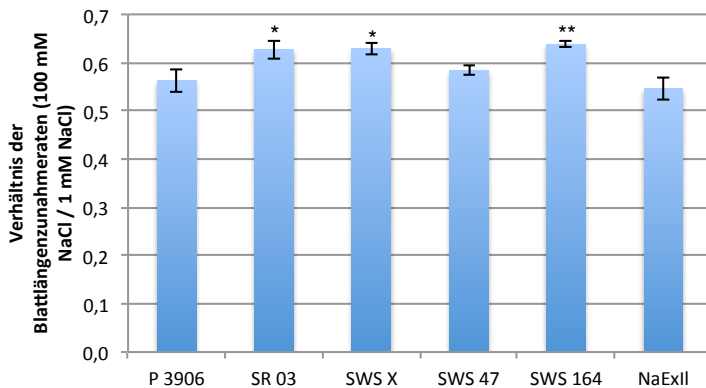


Abbildung 3.5: Einfluss von Salzstress auf das Verhältnis der Blattlängenzunahmeraten verschiedener Genotypen vom 18. auf den 20. Tag des Wachstum mit 4 bzw. 6 Tagen 100 mM NaCl im Vergleich zu 1 mM NaCl.
t-Test: * $p \leq 5\%$ ** $p \leq 1\%$

Das Verhältnis der Blattlängenzunahmeraten war bei den Genotypen SR 03, SWS X, und SWS 164 signifikant besser im Vergleich mit Pioneer 3906. Der Genotyp SWS 164 zeigte ein signifikant besseres Wachstumsverhältnis als Pioneer 3906 auf dem Niveau von $p \leq 1\%$, während sich SR 03 und SWS X auf dem Niveau von $p \leq 5\%$ befanden.

3.2 Versuch 2 - Extensibilität der Zellwand

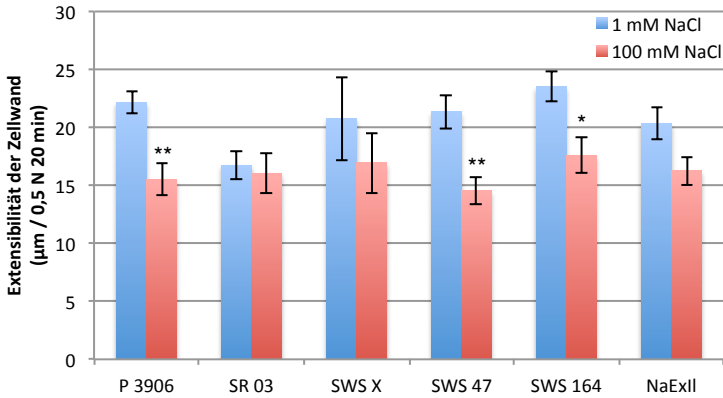


Abbildung 3.6: Einfluss von Salzstress auf die Extensibilität der Zellwand verschiedener Genotypen nach 21 Tagen Wachstum mit 7 Tagen 1 mM bzw. 100 mM NaCl.
t-Test: * $p \leq 5\%$ ** $p \leq 1\%$

Salzstress der ersten Phase beeinflusste die Zellwandextensibilität verschiedener Maisgenotypen unterschiedlich. Pioneer 3906, welcher einen in der ersten Phase empfindlichen Genotypen darstellt, zeigte eine signifikante Verminderung der Zellwandextensibilität. SR 03, welcher Resistenz in der ersten Phase des Salzstresses zeigt, hielt die Zellwandextensibilität aufrecht. Die Mutterlinien SWS 47 (SR 03) und SWS 164 (SR 12) zeigten unter diesen Bedingungen einen signifikanten Rückgang während ihr Kreuzungsprodukt SWS X die Zellwandextensibilität aufrecht erhalten konnte. Die Vaterlinie der SR-Hybriden, NaExII, zeigte unter Salzstress der ersten Phase keinen Rückgang der Zellwandextensibilität.

3.3 Versuch 3 - Calcium

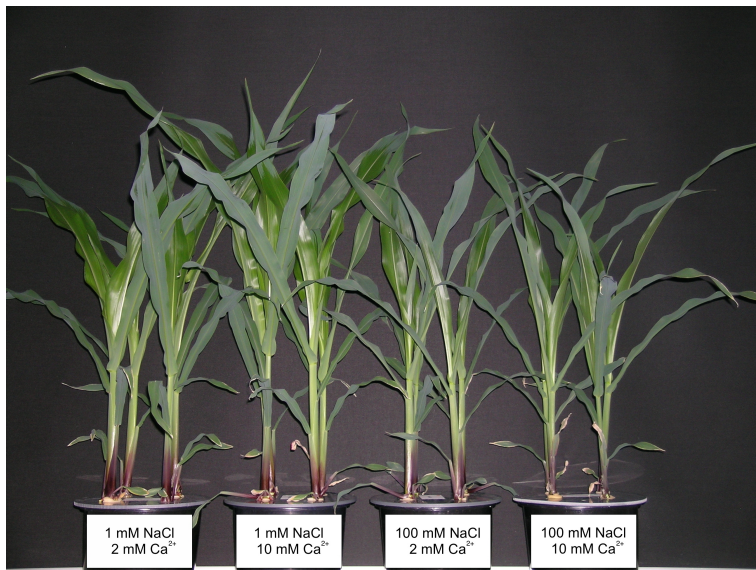


Abbildung 3.7: Einfluss von Salzstress und Calciumkonzentration in der Nährlösung auf Pioneer 3906 nach 21 Tagen Wachstum mit 7 Tagen 1 mM bzw. 100 mM NaCl und 2 mM bzw. 10 mM Calcium.

Die Pflanzen zeigten in den Varianten mit 100 mM NaCl Salzstress Symptome der ersten Phase, hier zu erkennen an kleinerem Wuchs und der dunkleren Farbe der Blätter. Da keine Ionentoxizität zu erkennen war, wurde zweite die zweite Phase des Salzstress nicht erreicht. Deutliche Unterschiede durch eine unterschiedliche Calciumernährung waren weder in den Varianten mit 1 mM NaCl noch in den Varianten mit 100 mM NaCl zu erkennen. Ein Calciummangel, welcher sich bei Mais mit dem schlechten Entfalten der jüngsten Blätter äußert, wurde bei keiner der Pflanzen festgestellt.

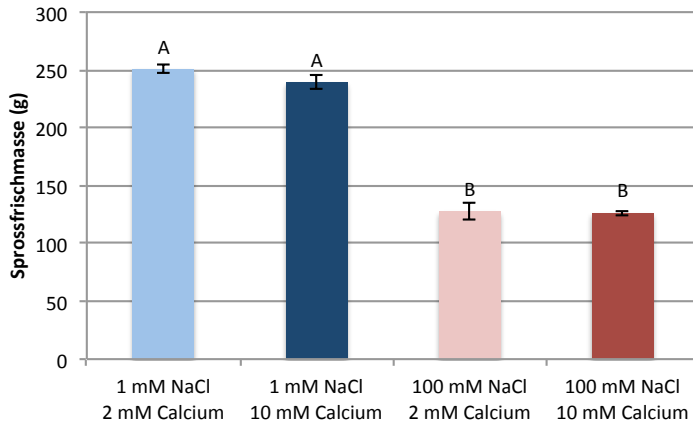


Abbildung 3.8: Einfluss von Salzstress und Calciumkonzentration in der Nährlösung auf die Sprossfrischmasse von Pioneer 3906 nach 21 Tagen Wachstum mit 7 Tagen 1 mM bzw. 100 mM NaCl und 2 mM bzw. 10 mM Calcium.
ANOVA: $p \leq 5\%$

Die Sprossfrischmasse (Abb. 3.8) war durch 100 mM NaCl Salzstress gegenüber den Varianten mit 1 mM NaCl signifikant reduziert. Ein Einfluss der Calciumernährung konnte statistisch nicht abgesichert werden.

3 Ergebnisse

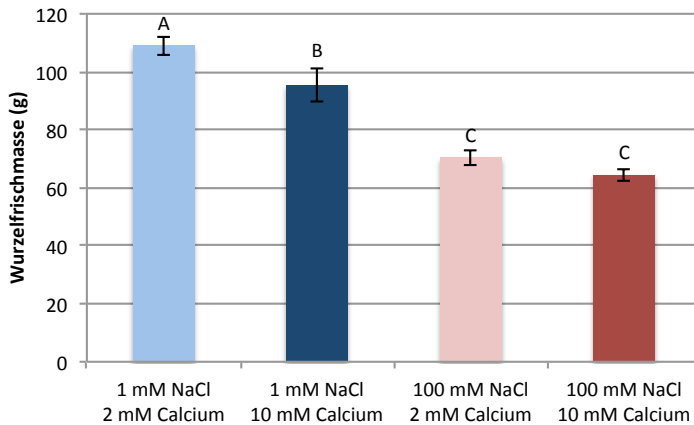


Abbildung 3.9: Einfluss von Salzstress und Calciumkonzentration in der Nährlösung auf die Wurzelfrischmasse von Pioneer 3906 nach 21 Tagen Wachstum mit 7 Tagen 1 mM bzw. 100 mM NaCl und 2 mM bzw. 10 mM Calcium.
ANOVA: $p \leq 5\%$

Die Wurzelfrischmasse (Abb. 3.9) war durch 100 mM NaCl Salzstress gegenüber den Varianten mit 1 mM NaCl signifikant reduziert. In den Varianten mit 1 mM NaCl war durch die verminderte Calciumgabe von 2 mM Calcium die Wurzelfrischmasse signifikant vergrößert. In den Salzstress-Varianten mit 100 mM NaCl konnte dieser Effekt statistisch nicht abgesichert werden.

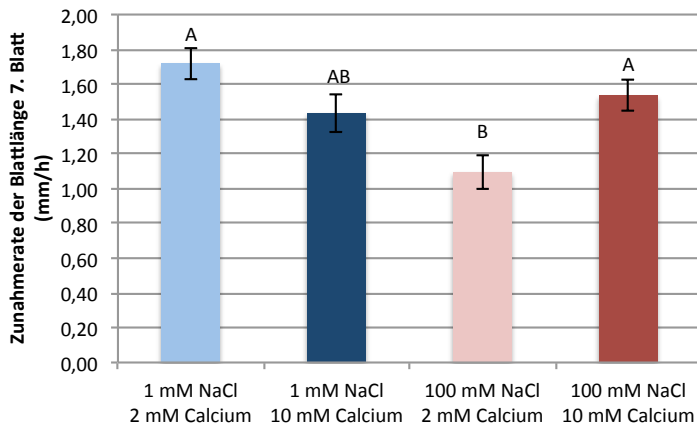


Abbildung 3.10: Einfluss von Salzstress und Calciumkonzentration in der Nährlösung auf die Zunahmerate der Blattlängen über 48 h von Pioneer 3906 nach 21 Tagen Wachstum mit 7 Tagen 1 mM bzw. 100 mM NaCl und 2 mM bzw. 10 mM Calcium.
ANOVA: $p \leq 5\%$

Die Zunahmerate der Blattlänge wurde durch 100 mM NaCl Salzstress gegenüber der Variante 1 mM NaCl + 2 mM Calcium signifikant reduziert. Eine erhöhte Calciumgabe von 10 mM unter 100 mM NaCl Salzstress führte zur Wiederherstellung der Blattlängenzunahmerate auf das Niveau der Variante mit 1 mM NaCl und 2 mM Calcium. Durch eine erhöhte Calciumgabe von 10 mM konnten die Blattlängenzunahmerate unter Salzstress wiederhergestellt werden.

3 Ergebnisse

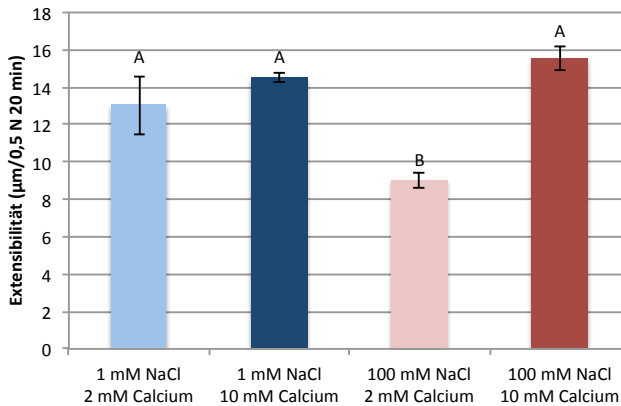


Abbildung 3.11: Einfluss von Salzstress und Calciumkonzentration in der Nährlösung auf die Extensibilität der Zellwand von Pioneer 3906 nach 21 Tagen Wachstum mit 7 Tagen 1 mM bzw. 100 mM NaCl und 2 mM bzw. 10 mM Calcium. ANOVA: $p \leq 5\%$

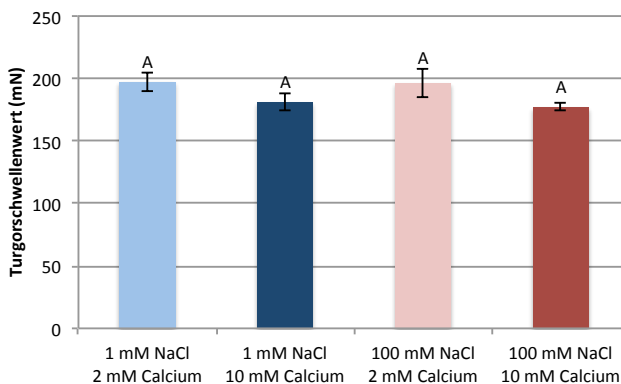


Abbildung 3.12: Einfluss von Salzstress und Calciumkonzentration in der Nährlösung auf den Turgorschwellenwert der Zellwand von Pioneer 3906 nach 21 Tagen Wachstum mit 7 Tagen 1 mM bzw. 100 mM NaCl und 2 mM bzw. 10 mM Calcium. ANOVA: $p \leq 5\%$

3.3 Versuch 3 - Calcium

Die Extensibilität der Zellwand wurde durch 100 mM NaCl Salzstress signifikant reduziert. Durch eine Erhöhung der Calciumkonzentration auf 10 mM konnte die Extensibilität unter Salzstress wiederhergestellt werden.

Der Turgorschwellenwert der Zellwand des Genotypen Pioneer 3906 wurde weder durch Salzstress der ersten Phase noch durch eine veränderte Calciumkonzentration beeinflusst.

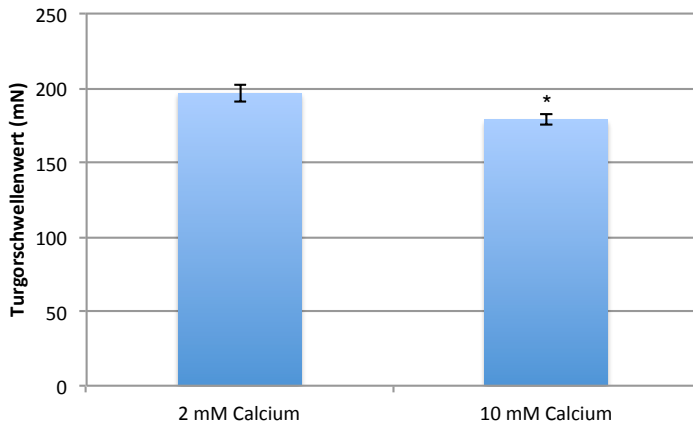


Abbildung 3.13: Einfluss von Salzstress und Calciumkonzentration in der Nährlösung auf den Turgorschwellenwert der Zellwand von Pioneer 3906 nach 21 Tagen Wachstum 2 mM bzw. 10 mM Calcium.

ANOVA: $p \leq 5\%$; 8 Wiederholungen/Variante

Wurde der Einfluss von Calcium auf den Turgorschwellenwert der Zellwand unabhängig vom Salzstress betrachtet, konnte ein signifikanter Einfluss festgestellt werden. Eine erhöhte Calciumkonzentration führte zu einem niedrigeren Turgorschwellenwert bei Pioneer 3906.

3 Ergebnisse

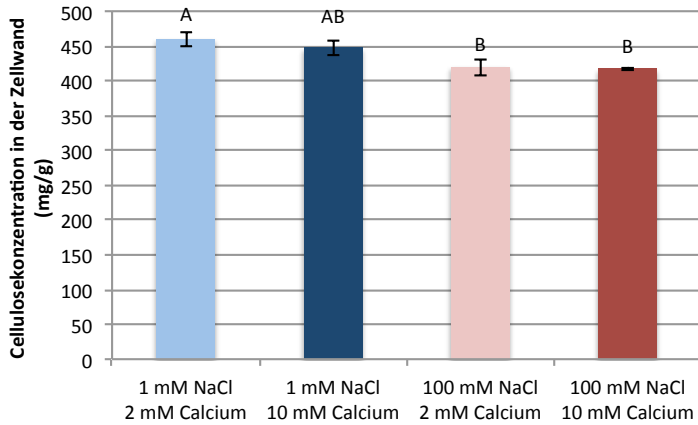


Abbildung 3.14: Einfluss von Salzstress und Calciumkonzentration in der Nährlösung auf die Cellulosekonzentration in der Zellwand von Pioneer 3906 nach 21 Tagen Wachstum mit 7 Tagen 1 mM bzw. 100 mM NaCl und 2 mM bzw. 10 mM Calcium.
ANOVA: $p \leq 5\%$

Die Cellulosekonzentration in der Zellwand wurde durch 100 mM NaCl gegenüber 1 mM NaCl signifikant reduziert. Hierbei führte eine höhere Calciumgabe von 10 mM Calcium zu einer weiteren Verminderung der Cellulosekonzentration. Dieser Effekt war auch schon in der Variante mit 1 mM NaCl zu erkennen, jedoch nicht statistisch abzusichern.

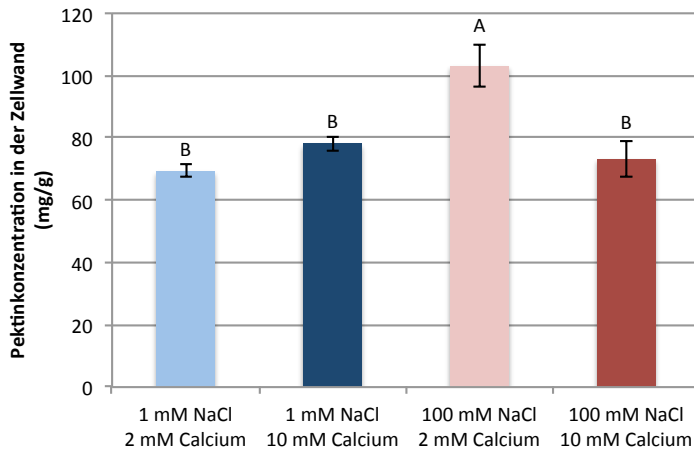


Abbildung 3.15: Einfluss von Salzstress und Calciumkonzentration in der Nährlösung auf die Pectinkonzentration in der Zellwand von Pioneer 3906 nach 21 Tagen Wachstum mit 7 Tagen 1 mM bzw. 100 mM NaCl und 2 mM bzw. 10 mM Calcium.
ANOVA: $p \leq 5\%$

Die Konzentration des Pectins in der Zellwand wurde durch die Gabe von 100 mM NaCl signifikant erhöht. Eine erhöhte Calciumkonzentration von 10 mM senkte in der Variante mit 100 mM NaCl die Pectinkonzentration auf das Niveau der Varianten mit 1 mM NaCl.

3 Ergebnisse

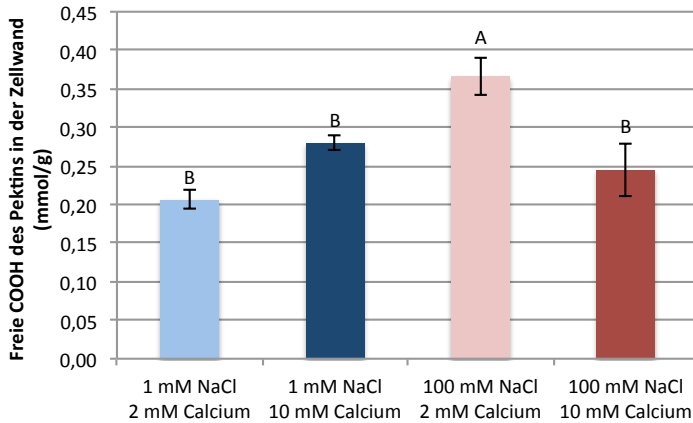


Abbildung 3.16: Einfluss von Salzstress und Calciumkonzentration in der Nährlösung auf die Konzentration der freien Carboxylgruppen des Pectins in der Zellwand von Pioneer 3906 nach 21 Tagen Wachstum mit 7 Tagen 1 mM bzw. 100 mM NaCl und 2 mM bzw. 10 mM Calcium.
ANOVA: $p \leq 5\%$

Die Konzentration der freien Carboxylgruppen des Pectins in der Zellwand wurde in den Variante mit verminderter Calciumversorgung durch Salzstress signifikant erhöht. Durch eine erhöhte Gabe von Calcium konnte dieser Effekt vollständig kompensiert werden.

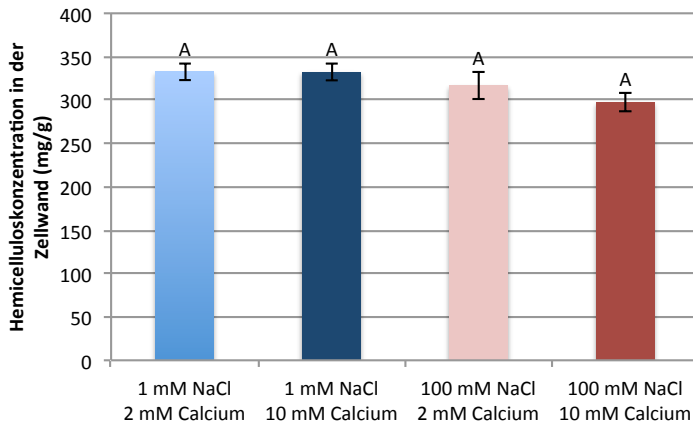


Abbildung 3.17: Einfluss von Salzstress und Calciumkonzentration in der Nährlösung auf die Hemicellulosekonzentration in der Zellwand von Pioneer 3906 nach 21 Tagen Wachstum mit 7 Tagen 1 mM bzw. 100 mM NaCl und 2 mM bzw. 10 mM Calcium.
ANOVA: $p \leq 5\%$

Die Konzentration der Hemicellulose in der Zellwand wurde durch eine erhöhte Gabe von Calcium in der Nährlösung nicht beeinflusst. Auch Salzstress hatte keinen statistisch abzusichernden Einfluss.

3 Ergebnisse

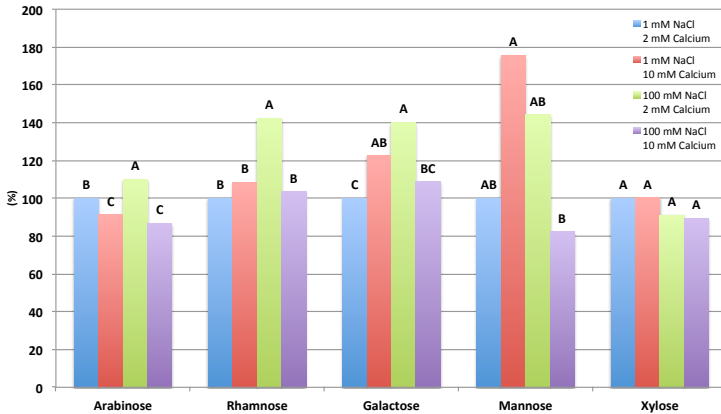


Abbildung 3.18: Einfluss von Salzstress und Calciumkonzentration in der Nährlösung auf die Verhältnisse der Monomerkonzentrationen der Hemicellulose in der Zellwand von Pioneer 3906 nach 21 Tagen Wachstum mit 7 Tagen 1 mM bzw. 100 mM NaCl und 2 mM bzw. 10 mM Calcium.

Variante 1 mM NaCl mit 2 mM Calcium = 100%
ANOVA: $p \leq 5\%$

Salzstress erhöhte die Konzentrationsverhältnisse der Monomere Arabinose, Rhamnose und Galactose signifikant, während bei Mannose und Xylose keine signifikante Veränderung vorlag. Die Gabe von zusätzlichem Calcium unter Salzstress führte zu einer Wiederherstellung der Konzentrationsverhältnisse von Arabinose, Rhamnose und Galactose auf das Kontrollniveau, während die Konzentration der Mannose unter das Niveau der Kontrolle fiel.

3.4 Züchtung

3.4.1 Doppelhaploide

Aus der Kreuzung (SWS 47 × SWS 164) × UH 400 gingen 11521 Körner hervor (D₁-Generation). Hiervon waren 960 Körner haploid (8,3%), 96 Körner ausgekreuzt oder geselbstet (0,8%) und 10465 Körner F₁ Hybriden (90,8%).

Während der Keimung und Verdopplung des Chromosomensatzes wurden 104 Keimlinge auf Grund von Diploidie aussortiert (10,8%), 162 Keimlinge gingen durch Pilzbefall in den Keimschalen verloren (16,9%) und 1 Korn keimte nicht. Die Keimrate betrug 99,9%. Es wurden 693 doppelhaploide Keimlinge gewonnen (72,2%) und ausgepflanzt. Nach Selbstung und Abreife konnten 86 mögliche Linien mit durchschnittlich 41 Körnern (Min = 1 Korn, Max = 188 Körner, Gesamt = 3551 Körner) geerntet werden (D₂-Generation).

Nach dem Screening der möglichen Linien und der Selbstung der 20 besten konnte von 7 Linien doppelhaploides Saatgut geerntet werden (D₃-Generation). Von den Linien DH 6 und DH 7 wurden weniger als 10 Körner geerntet. Die Kreuzung der DH-Linien mit der Natrium exkludierenden Inzuchtlinie wurde mit den Linien DH 1 bis DH 5 durchgeführt. Parallel hierzu wurden alle Linien zur Saatgutvermehrung geselbstet (Tab. 3.1) (D₄-Generation).

Tabelle 3.1: Anzahl der Körner aus Selbstungen (DH-Linien) und Kreuzungen (DH-Linien × NaExII = DSR-Hybride)

Selbstungen		Kreuzungen	
Genotyp	Körner	Genotyp	Körner
DH 1	991	DSR 1	774
DH 2	869	DSR 2	827
DH 3	803	DSR 3	592
DH 4	147	DSR 4	251
DH 5	45	DSR 5	118
DH 6	28		
DH 7	10		

3.4.2 Test der DSR-Hybriden auf Salzresistenz

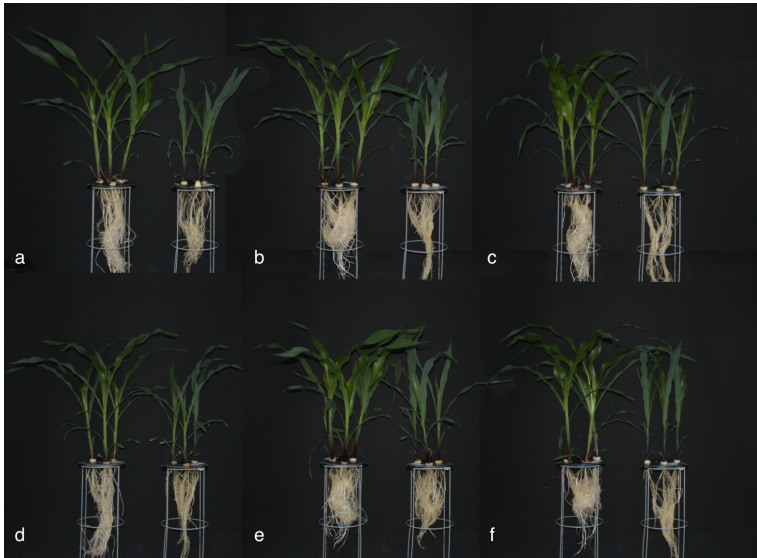


Abbildung 3.19: Einfluss von Salzstress nach 21 Tagen Wachstum mit 7 Tagen 1mM bzw. 150 mM NaCl.

a) Pioneer 3906 b) DSR 1 c) DSR 2 d) DSR 3 e) DSR 4 f) DSR 5

Jeweils 1 mM NaCl links, 150 mM NaCl rechts

Abgesehen von DSR 1 befanden sich alle Genotypen der Variante mit 150 mM NaCl in der ersten Phase des Salzstresses, welche sich in einem verminderten Wachstum und der dunkleren Blattfarbe äußerte (Abb. 3.19). DSR 1 zeigte in der Variante mit 150 mM NaCl Symptome von Ionentoxizität in Form von Blattrandnekrosen und befand sich somit in der 2. Phase des Salzstresses.

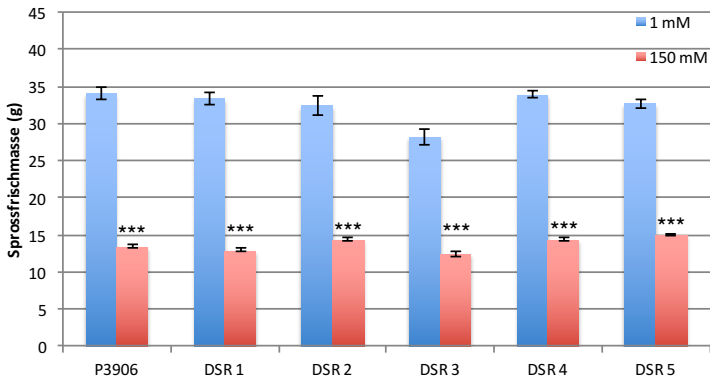


Abbildung 3.20: Einfluss von Salzstress auf die Sprossfrischmassen von Pioneer 3906 und der neu entwickelten DSR-Hybriden nach 21 Tagen Wachstum mit 7 Tagen 1 mM bzw. 150 mM NaCl.
t-Test: $p^{***} \leq 0,05\%$

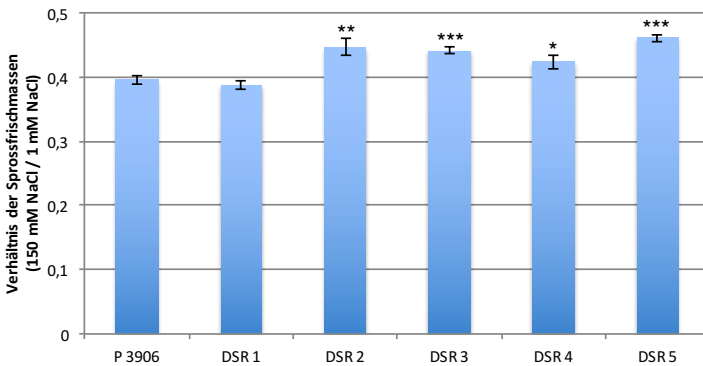


Abbildung 3.21: Einfluss von Salzstress auf das Verhältnis der Sprossfrischmassen 150 mM NaCl/1 mM NaCl von Pioneer 3906 und der neu entwickelten DSR-Hybriden nach 21 Tagen Wachstum mit 7 Tagen 1 mM bzw. 150 mM NaCl.
t-Test: $p^* \leq 5\%$ $p^{**} \leq 1\%$ $p^{***} \leq 0,05\%$

3 Ergebnisse

Die Sprossfrischmassen waren bei allen Genotypen durch 150 mM NaCl signifikant vermindert (Abb. 3.20), jedoch zeigte sich eine Verbesserung im Verhältnis der Sprossfrischmassen von 150 mM/1 mM NaCl (Abb. 3.21). Die Genotypen DSR 2, DSR 3, DSR 4 und DSR 5 wiesen gegenüber Pioneer 3906 ein verbessertes Frischmassenverhältnis auf, während DSR 1 sich auf dem gleichen Niveau wie Pioneer 3906 befand.

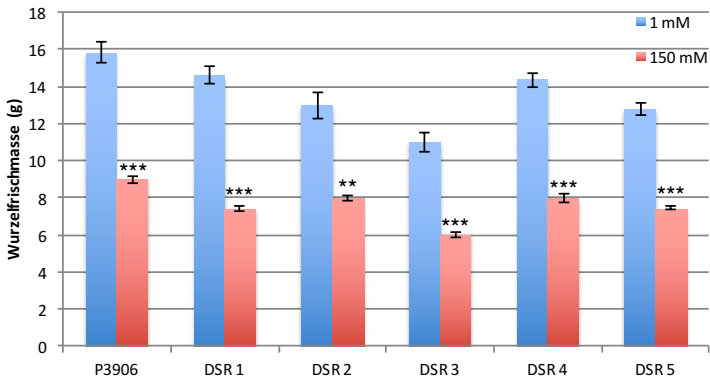


Abbildung 3.22: Einfluss von Salzstress auf die Wurzelfrischmassen von Pioneer 3906 und der neu entwickelten DSR-Hybriden nach 21 Tagen Wachstum mit 7 Tagen 1 mM bzw. 150 mM NaCl.
t-Test: $p^{**} \leq 1\%$ $p^{***} \leq 0,05\%$

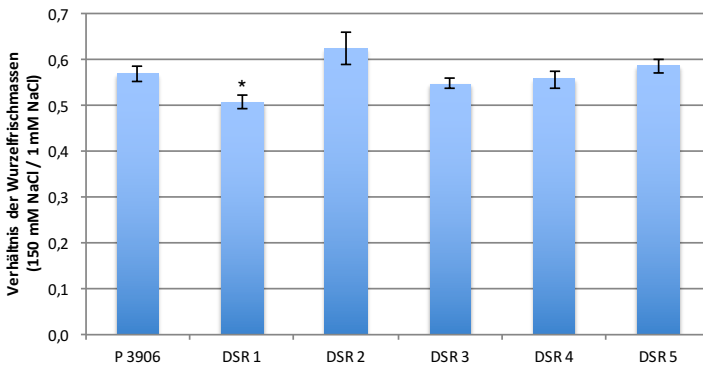


Abbildung 3.23: Einfluss von Salzstress auf das Verhältnis der Wurzelfrischmassen 150 mM NaCl/1 mM NaCl von Pioneer 3906 und der neu entwickelten DSR-Hybriden nach 21 Tagen Wachstum mit 7 Tagen 1 mM bzw. 150 mM NaCl.
t-Test: $p^* \leq 5\%$ $p^{**} \leq 1\%$ $p^{***} \leq 0,05\%$

3 Ergebnisse

Die Wurzelfrischmassen aller Genotypen wurde durch 150 mM NaCl signifikant gegenüber 1 mM NaCl reduziert (Abb. 3.22). Beim Vergleich der Verhältnisse 150 mM/1 mM NaCl zeigte DSR 1 eine signifikante Verminderung. DSR 2 zeigte eine statistisch nicht abzusichernde Vergrößerung des Verhältnisses der Wurzelfrischmasse (Abb. 3.23).

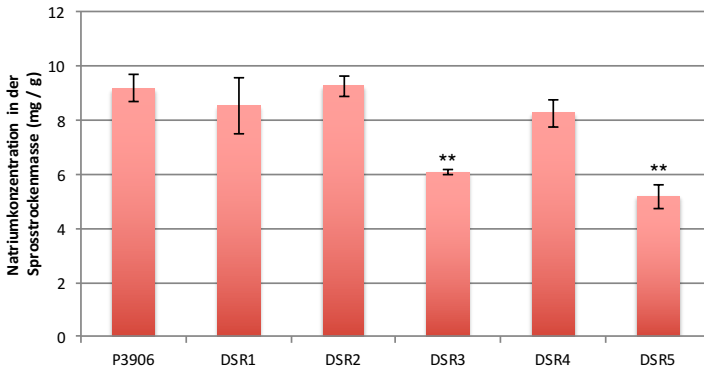


Abbildung 3.24: Einfluss von Salzstress auf die Natriumkonzentration im Spross von Pioneer 3906 und der neu entwickelten DSR-Hybriden nach 21 Tagen Wachstum mit 7 Tagen 150 mM NaCl.
t-Test: $p^{**} \leq 1\%$

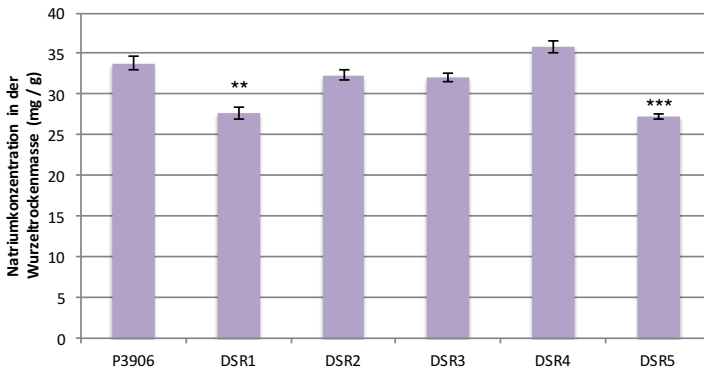


Abbildung 3.25: Einfluss von Salzstress auf die Natriumkonzentration in der Wurzel von Pioneer 3906 und der neu entwickelten DSR-Hybriden nach 21 Tagen Wachstum mit 7 Tagen 150 mM NaCl.
t-Test: $p^{**} \leq 1\%$ $p^{***} \leq 0,05\%$

3 Ergebnisse

Die Genotypen DSR 3 und DSR 5 zeigten in der Variante mit 150 mM NaCl eine signifikante Verminderung der Natriumkonzentration in der Sprosstrockenmasse im Vergleich mit Pioneer 3906. Die Genotypen DSR 1, DSR 2 und DSR 4 zeigten keinen Unterschied gegenüber Pioneer 3906 (Abb. 3.24).

Die Natriumkonzentration in der Wurzeltrockenmasse war in den Varianten mit 150 mM NaCl bei den Genotypen DSR 1 und DSR 5 gegenüber Pioneer 3906 signifikant vermindert. Die Genotypen DSR 2, DSR 3 und DSR 4 zeigten keine Unterschiede gegenüber Pioneer 3906 (Abb. 3.25).

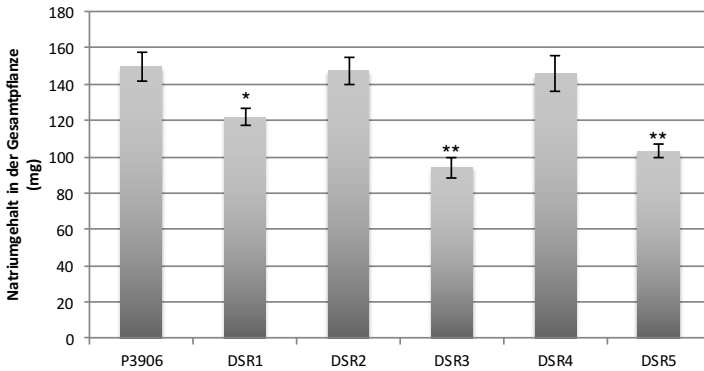


Abbildung 3.26: Einfluss von Salzstress auf den Natriumgehalt in der Gesamtpflanze (Spross und Wurzel) von Pioneer 3906 und der neu entwickelten DSR-Hybriden nach 21 Tagen Wachstum mit 7 Tagen 150 mM NaCl.
t-Test: $p^* \leq 5\%$ $p^{**} \leq 1\%$

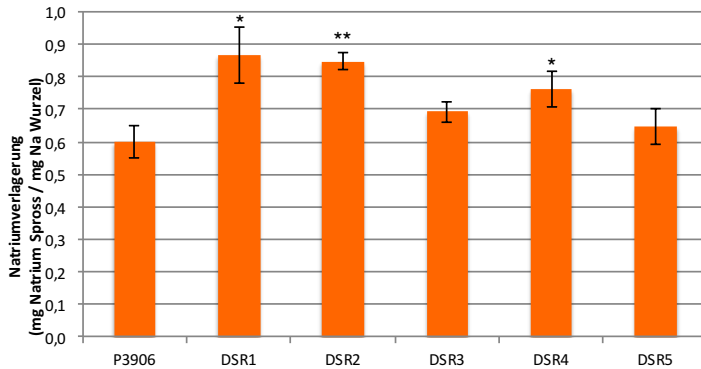


Abbildung 3.27: Einfluss von Salzstress auf die Natriumverlagerung von Pioneer 3906 und der neu entwickelten DSR-Hybriden nach 21 Tagen Wachstum mit 7 Tagen 150 mM NaCl.
t-Test: $p^* \leq 5\%$ $p^{**} \leq 1\%$

3 Ergebnisse

Der Natriumgehalt in der Gesamtpflanze war in der Variante mit 150 mM NaCl in den Genotypen DSR 1, DSR 3 und DSR 5 gegenüber Pioneer 3906 signifikant reduziert. Die Genotypen DSR 2 und DSR 4 wiesen den gleichen Natriumgehalt wie Pioneer 3906 auf (Abb. 3.26).

Die Natriumverlagerung war unter Salzstress in den Genotypen DSR 1, DSR 2 und DSR 4 signifikant gegenüber Pioneer 3906 erhöht. Die Genotypen DSR 3 und DSR 5 zeigten eine ähnliche Verlagerung wie Pioneer 3906 (Abb. 3.27).

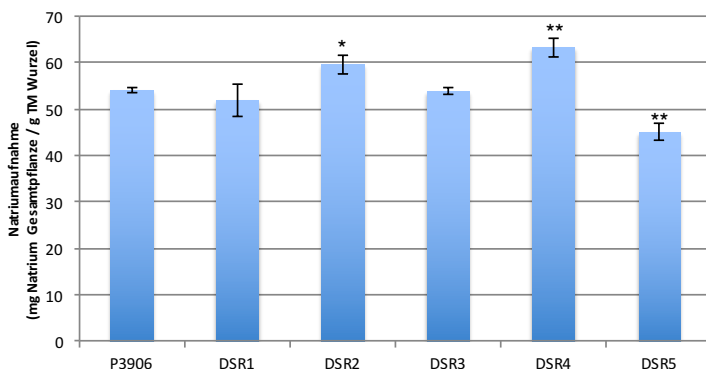


Abbildung 3.28: Einfluss von Salzstress auf die Natriumaufnahme (Natriumgehalt der Gesamtpflanze/Wurzeltrockenmasse) von Pioneer 3906 und der neu entwickelten DSR-Hybriden nach 21 Tagen Wachstum mit 7 Tagen 150 mM NaCl.
t-Test: $p^* \leq 5\%$ $p^{**} \leq 1\%$

Die Genotypen DSR 2 und DSR 4 zeigten eine signifikante Erhöhung der Natriumaufnahme in der Variante mit 150 mM NaCl gegenüber Pioneer 3906. Die Genotypen DSR 1 und DSR 3 zeigten keine Veränderung, während bei dem Genotypen DSR 5 eine signifikante Verminderung der Natriumaufnahme gegenüber Pioneer 3906 festzustellen war (Abb. 3.28).

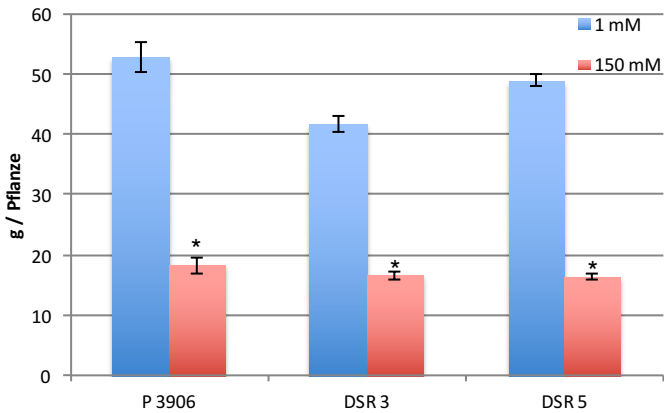


Abbildung 3.29: Einfluss von Salzstress auf die Sprossfrischmassen von Pioneer 3906, DSR 3 und DSR 5 nach 21 Tagen Wachstum mit 7 Tagen 1 mM bzw. 150 mM NaCl.
t-Test: $p^{***} \leq 0,05\%$

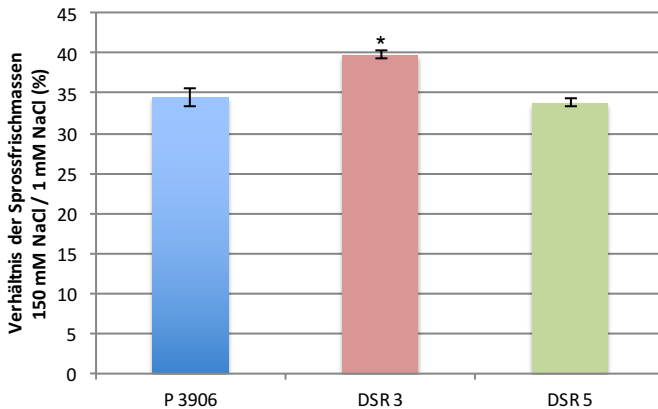


Abbildung 3.30: Einfluss von Salzstress auf das Verhältnis der Sprossfrischmassen 1 mM NaCl/150 mM NaCl von Pioneer 3906, DSR 3 und DSR 5 nach 21 Tagen Wachstum mit 7 Tagen 1 mM bzw. 150 mM NaCl.
t-Test: $p^{***} \leq 0,05\%$

3 Ergebnisse

Die Frischmassen waren bei allen Genotypen durch 150 mM NaCl höchst signifikant gegenüber 1 mM NaCl reduziert.

Im Verhältnis der Sprossfrischmassen von 150 mM NaCl zu 1 mM NaCl zeigte der Genotyp DSR 3 eine höchst signifikante Verbesserung gegenüber dem Genotyp Pioneer 3906.

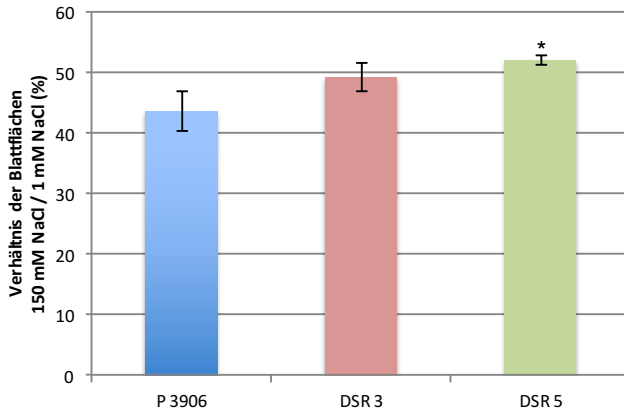


Abbildung 3.31: Einfluss von Salzstress auf das Verhältnis der Blattflächen 150 mM NaCl/1 mM NaCl von Pioneer 3906, DSR 3 und DSR 5 nach 21 Tagen Wachstum mit 7 Tagen 1mM bzw. 150 mM NaCl.
t-Test: $p^* \leq 5\%$

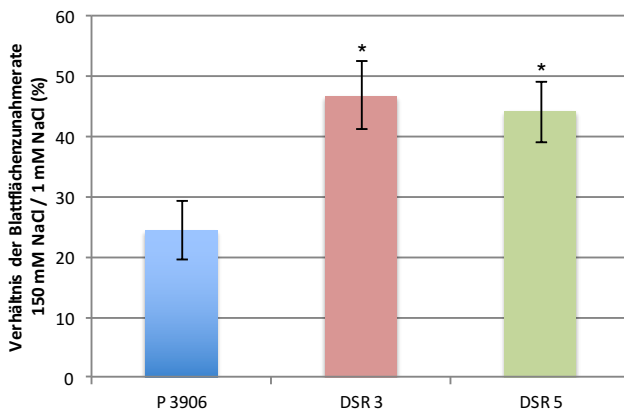


Abbildung 3.32: Einfluss von Salzstress auf das Verhältnis der Blattflächenzunahmerate 150 mM NaCl/1 mM NaCl von Pioneer 3906, DSR 3 und DSR 5 nach 21 Tagen Wachstum mit 7 Tagen 1 mM bzw. 150 mM NaCl.
t-Test: $p^* \leq 5\%$

3 Ergebnisse

DSR 5 zeigte im Bezug auf das Merkmal der Blattflächenverhältnisse 150 mM/1 mM NaCl eine verbesserte Reaktion gegenüber Salzstress im Vergleich mit Pioneer 3906. DSR 3 zeigte tendenziell eine Verbesserung gegenüber Pioneer 3906 jedoch konnte dieses Ergebnis statistisch nicht abgesichert werden.

Die Verhältnisse der Zunahmeraten der Blattflächen über 48 Stunden 150 mM/1 mM NaCl zeigten eine signifikante Verbesserung der Salzresistenz von DSR 3 und DSR 5 gegenüber Pioneer 3906.

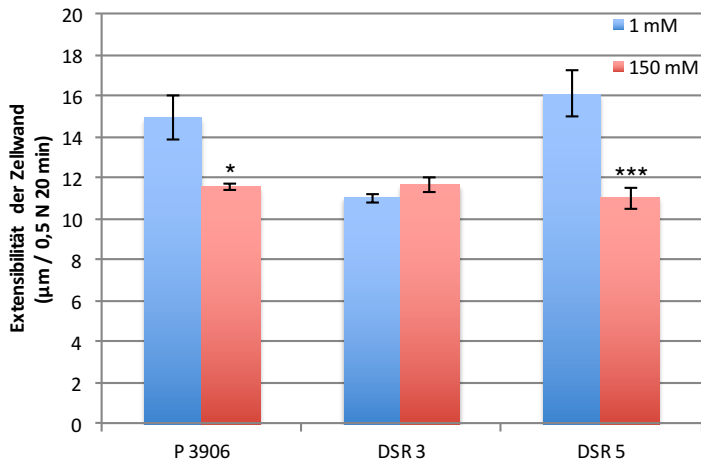


Abbildung 3.33: Einfluss von Salzstress auf die Extensibilität der Zellwand von Pioneer 3906, DSR 3 und DSR 5 nach 21 Tagen Wachstum mit 7 Tagen 1 mM bzw. 150 mM NaCl.

t-Test: $p^* \leq 5\%$ $p^{***} \leq 0,05\%$

Die Extensibilität der Zellwand war bei Pioneer 3906 und DSR 5 unter 150 mM NaCl Salzstress signifikant vermindert. DSR 3 konnte die Extensibilität der Zellwand unter Salzstress aufrecht erhalten.

3 Ergebnisse

Tabelle 3.2: Einfluss von Salzstress auf die Ansäuerung des Apoplasten von Pioneer 3906, DSR 3 und DSR 5 nach 21 Tagen Wachstum mit 7 Tagen 1 mM bzw. 150 mM NaCl.
t-Test: $p^* \leq 5\%$

pH-Werte im Apoplasten		
Mittelwerte	1 mM NaCl	150 mM NaCl
Pioneer 3906	6,66 ($\pm 0,14$)	7,03 ($\pm 0,09$) *
DSR 3	6,81 ($\pm 0,16$)	7,01 ($\pm 0,18$)
DSR 5	7,12 ($\pm 0,09$)	7,28 ($\pm 0,08$)

Unter Salzstress kommt es zu einer signifikanten Verminderung der apoplastischen Ansäuerung von Pioneer 3906. DSR 3 und DSR 5 können unter Salzstress die Ansäuerung der Zellwand aufrecht erhalten.

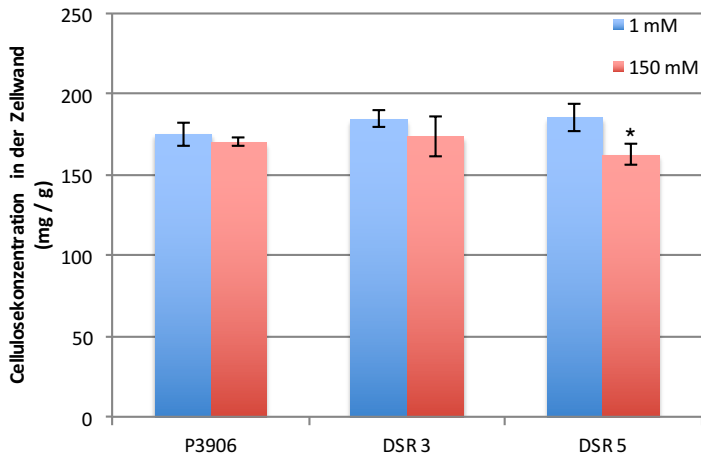


Abbildung 3.34: Einfluss von Salzstress auf die Cellulosekonzentration in der Zellwand von Pioneer 3906, DSR 3 und DSR 5 nach 21 Tagen Wachstum mit 7 Tagen 1 mM bzw. 150 mM NaCl.
t-Test: $p^* \leq 5\%$

Bei DSR 5 war die Cellulosekonzentration unter 150 mM NaCl Salzstress signifikant vermindert. Bei DSR 3 und Pioneer 3906 konnte keine Veränderung der Cellulosekonzentration nachgewiesen werden.

3 Ergebnisse

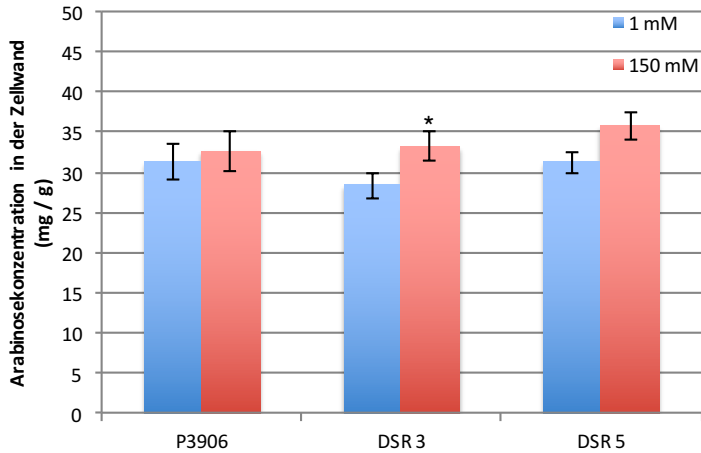


Abbildung 3.35: Einfluss von Salzstress auf die Arabinosekonzentration in der Zellwand von Pioneer 3906, DSR 3 und DSR 5 nach 21 Tagen Wachstum mit 7 Tagen 1 mM bzw. 150 mM NaCl.
t-Test: $p^* \leq 5\%$

Die Arabinosekonzentration in der Zellwand wurde bei Pioneer 3906 durch 150 mM NaCl Salzstress nicht verändert, während DSR 2 und DSR 5 eine signifikante Erhöhung der Arabinosekonzentration aufwiesen.

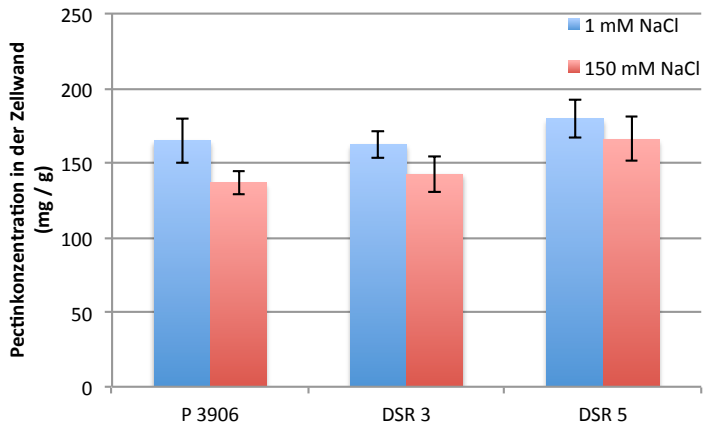


Abbildung 3.36: Einfluss von Salzstress auf die Pectinkonzentration in der Zellwand von Pioneer 3906, DSR 3 und DSR 5 nach 21 Tagen Wachstum mit 7 Tagen 1 mM bzw. 150 mM NaCl.

Eine Veränderung der Pectinkonzentration in der Zellwand durch 150 mM NaCl Salzstress konnte bei keinem der Genotypen statistisch abgesichert werden.

3 Ergebnisse

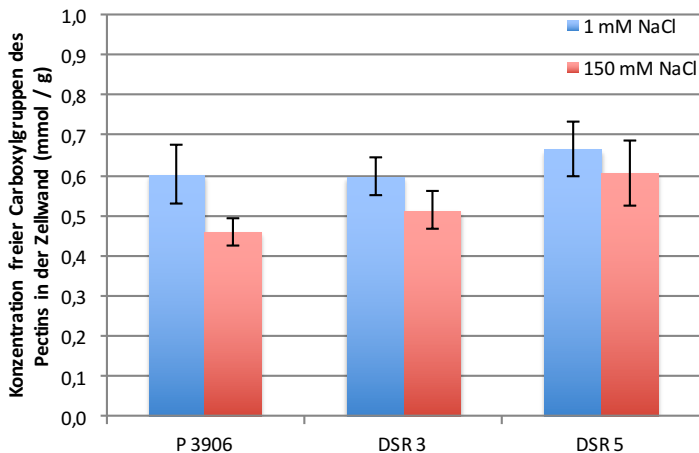


Abbildung 3.37: Einfluss von Salzstress auf die Konzentration der freien Carboxylgruppen des Pectins in der Zellwand von Pioneer 3906, DSR 3 und DSR 5 nach 21 Tagen Wachstum mit 7 Tagen 1 mM bzw. 150 mM NaCl.

Die Konzentration der freien Carboxylgruppen des Pectins war unter 150 mM NaCl Salzstress bei keinem der Genotypen signifikant verändert, jedoch konnte eine abnehmende Tendenz festgestellt werden.

3.5 Veränderung der Zellteilung durch Salzstress

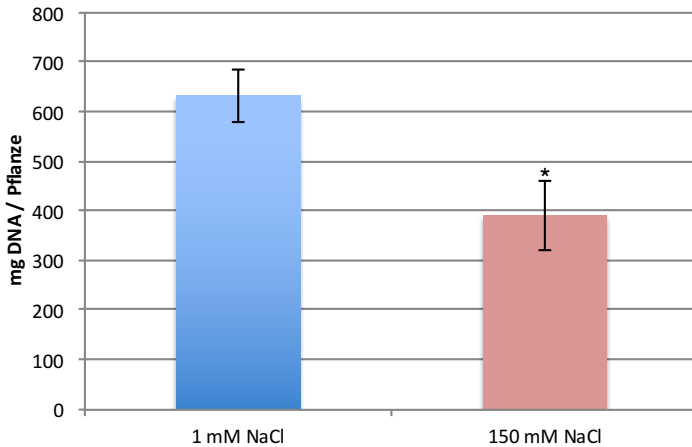


Abbildung 3.38: Einfluss von Salzstress auf den DNA-Gehalt im Spross von Pioneer 3906 nach 21 Tagen Wachstum mit 7 Tagen 1 mM bzw. 150 mM NaCl.
t-Test: $p^* \leq 5\%$, 2-seitiger t-Test

Der DNA-Gehalt, und somit die Anzahl der Zellen im Spross von Pioneer 3906, wurde durch 150 mM NaCl gegenüber 1 mM NaCl signifikant vermindert.

3 Ergebnisse

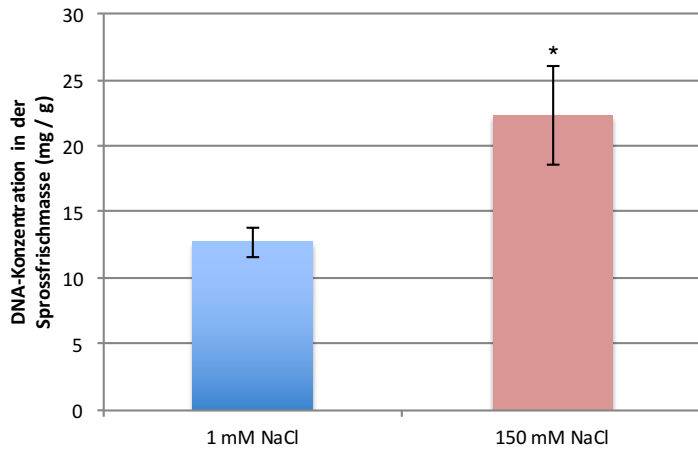


Abbildung 3.39: Einfluss von Salzstress auf die DNA-Konzentration in der Sprossfrischmasse von Pioneer 3906 nach 21 Tagen Wachstum mit 7 Tagen 1 mM bzw. 150 mM NaCl.
t-Test: $p^* \leq 5\%$, 2-seitiger t-Test

Die DNA-Konzentration in der Sprossfrischmasse wurde durch 150 mM NaCl gegenüber 1 mM NaCl signifikant erhöht.

4 Diskussion

4.1 Züchtung

In dieser Arbeit konnten durch Doppelhaploidenzüchtung neue Hybriden erstellt werden. Hierbei stachen, auf Grund ihrer verbesserten Resistenz im Vergleich mit Pioneer 3906, insbesondere die beiden Genotypen DSR 3 und DSR 5 heraus.

4.1.1 Resistenz in der ersten Phase des Salzstress

In der ersten Phase des Salzstress resistente Genotypen zeichnen sich insbesondere durch eine Aufrechterhaltung ihres Wachstums unter diesen Bedingungen im Vergleich mit Kontrollbedingungen aus und können mit dem herrschenden, osmotischen Stress umgehen (Munns & Tester 2008). Als Parameter für die Resistenz in der ersten Phase des Salzstress können die Verhältnisse von Sprossfrischmasse (Abb. 3.21) und die der Blattflächen der Behandlung mit 150 mM NaCl gegenüber 1 mM NaCl herangezogen werden (Abb. 3.31) (Schubert *et al.* 2009). Bis auf DSR 1 zeigten alle neu entwickelten DSR-Genotypen eine Verbesserung der Verhältnisse von Sprossfrischmasse und Blattflächen unter Salzstress gegenüber Pioneer 3906. Die Salzresistenz in der ersten Phase wurde somit in den neuen Genotypen DSR 2, DSR 3, DSR 4 und DSR 5 erfolgreich etabliert.

4.1.2 Resistenz in der zweiten Phase des Salzstress

Als Parameter für die zweite Phase des Salzstress wurden neben Symptomen von Natriumtoxizität (Abb. 3.19), die Natriumaufnahme über die Wurzel (Abb. 3.25) und die Natriumverlagerung von der Wurzel in den Spross (Abb.

3.27) genutzt. Pioneer 3906, welcher eine verbesserte Resistenz in der zweiten Phase des Salzstresses gegenüber empfindlichen Genotypen aufweist, ist in diesen Merkmalen weit überlegen (Schubert *et al.* 2009). Durch die Kreuzung der neu entwickelten Doppelhaploiden Linien mit der aus Pioneer 3906 hervorgehenden NaExII wurde versucht, auch diese Merkmale in die DSR-Hybriden einzukreuzen.

DSR 1 zeigte als einziger der neu erstellten Genotypen offensichtliche Natriumtoxizität in Form von Blattrandnekrosen (Abb. 3.19). DSR 1 befand sich somit in der zweiten Phase des Salzstresses und ist eindeutig nicht resistent.

Die Natriumaufnahme war bei den Genotypen DSR 2 und DSR 4 gegenüber Pioneer 3906 signifikant erhöht, während die Natriumaufnahme von DSR 5 signifikant vermindert war (Abb. 3.28). Dies lässt auf ein verbessertes Natriumexkursionsvermögen von DSR 5 gegenüber Pioneer 3906 schließen, während DSR 2 und DSR 4 eine Verschlechterung zeigten. Hierbei gilt jedoch zu beachten, dass diese Ergebnisse aus einem Nährlösungsexperiment stammen. Durch die ständige Durchmischung der Nährlösung kann die Anlieferung von Ionen an die Wurzeloberfläche vernachlässigt werden. Somit ist ein geeigneterer Parameter zur Bestimmung der Fähigkeit zur Natriumexklusion aus dem Spross der Natriumgehalt im Spross (Abb. 3.26). Hier zeigten die Genotypen DSR 1, DSR 3 und DSR 5 eine signifikante Verminderung gegenüber Pioneer 3906 und somit ein verbessertes Exkursionsverhalten von Natrium.

Die Natriumverlagerung von der Wurzel in den Spross zeigte jedoch für die Genotypen DSR 1, DSR 2 und DSR 4 eine Erhöhung im Vergleich mit Pioneer 3906 (Abb. 3.27). Dieses Merkmal der Resistenz in der zweiten Phase des Salzstresses konnte somit nicht in diese Genotypen eingekreuzt werden.

Ein Versuch zur Erklärung könnte in einer verminderten Kombinationsfähigkeit der Eltern liegen (DH 1, DH 2 und DH 4). Durch die veränderte Genetik können die Merkmale einer verminderten Wurzel-zu-Spross Verlagerung und einer verbesserten Natriumexklusion aus dem Spross nicht in gleichem Maße wie bei Pioneer 3906 ausgebildet werden. DSR 1 zeigt sogar trotz einer verbesserten Natriumexklusion aus dem Spross Symptome von Ionentoxizität. Dies sind Hinweise darauf, dass es sich auch für die Salzresistenz in der zweiten Phase nicht um einen einfachen Erbgang handelt, sondern mehrere Gene an der Ausbildung der Merkmale beteiligt sind (Schubert 2011).

Obwohl die Genotypen DSR 2 und DSR 4 keine Symptome von Ionentoxizität zeigten, konnte das Zuchtziel der Einkreuzung der Merkmale der verminderten Natriumaufnahme und der verminderten Wurzel-zu-Spross Verlagerung nicht erreicht werden. Beide Zuchtziele, die Verbesserung der Resistenz in der ersten Phase des Salzstresses und das der Verbesserung der Resistenz in der zweiten Phase des Salzstresses, konnten nur in den Genotypen DSR 3 und DSR 5 erreicht werden.

4.2 Zellteilung und -streckung

Unter Salzstress der ersten Phase kann eine verzögerte Entwicklung von Mais beobachtet werden (Munns & Tester 2008). Diese äußert sich nicht nur durch kleinere Pflanzen, sondern auch durch eine verzögerte Entwicklung der Pflanzenorgane. Ein typisches Zeichen hierfür ist das verzögerte Erscheinen der einzelnen Blätter, sowie eine spätere Blüte unter Salzstress (Hütsch *et al.* 2014). Neben einer möglichen verminderten Zellwandextensibilität sollte eine Verminderung der Zellteilung kleinere Pflanzen verursachen, da diese den Grundstock an expandierenden Zellen legt (Richter 1998).

Zur Messung der Zellteilung unter Salzstress wurde der DNA-Gehalt des Sprosses genutzt. Der DNA-Gehalt/Pflanzenzelle ist unabhängig von der Zellgröße und von der Anzahl der Chloroplasten und Mitochondrien annähernd konstant, da das nucleare Maisgenom eine Größe von 2300 MBp besitzt, während das Genom der Mitochondrien mit 200 kBp und der Chloroplasten mit 145 kBp vergleichsweise klein ist (Taiz & Zeiger 2006) und somit nur geringen Einfluss auf den DNA-Gehalt der Zelle hat. Bei einer durchschnittlichen Anzahl von 278 Chloroplasten- und 16 Mitochondriengenomen in Zellen von Maisblättern beträgt der Anteil an der Gesamt-DNA in der Zelle nur 0,4% (Lutz *et al.* 2011).

Jedoch ist unter Salzstress die Anzahl der Mitochondrien erhöht (Hecht-Buchholz 1972). Dies kann auf einen erhöhten Energiebedarf für die Exklusion von Natrium zurückzuführen sein, oder eine kompensatorische Reaktion auf Grund einer gehemmten Stoffwechselreaktion der Mitochondrien (Koyro 1997). Gleichzeitig kann es zu einer leichten Erhöhung der Anzahl der Chloroplasten unter

4 Diskussion

Salzstress der ersten Phase kommen (Peharec Štefanić *et al.* 2013). Beide Effekte erhöhen den DNA-Gehalt in der Zelle. Jedoch wird eine mögliche Erhöhung durch den schon beschriebenen Größenunterschied des nuclearen, im Vergleich mit dem mitochondrialen bzw. chloroplastischen Genom, bei weitem überlagert. Selbst eine Verdopplung der Anzahl der Mitochondrien und Chloroplasten würde eine Erhöhung des DNA-Gehaltes/Zelle von unter 0,5% bewirken. Dieser Wert kann somit in der Berechnung der Zellzahl vernachlässigt werden, und der DNA-Gehalt/Spross ist vorwiegend von der Anzahl der Zellen abhängig (Kap. 2.13).

Pioneer 3906 reagierte unter Salzstress mit einem stark verminderten DNA-Gehalt im Spross (Abb. 3.38). Hieraus folgt, dass die Zellteilung durch Salzstress vermindert war und somit weniger Zellen im Spross ausgebildet wurden. Auch die Verzögerung der Entwicklung unter Salzstress kann hiermit teilweise erklärt werden.

Da der DNA-Gehalt/Zelle gleich ist, kann neben dem DNA-Gehalt zur Berechnung der Anzahl der Zellen, die Konzentration der DNA/g FM zur Berechnung der Anzahl der Zellen/g FM genutzt werden. Dies wiederum erlaubt einen Rückschluss auf die Zellgröße (Kap. 2.13). Pioneer 3906 reagierte mit DNA-Konzentrationen unter Salzstress, die nahezu doppelt so groß wie unter Kontrollbedingungen waren (Abb. 3.39). Die Zellen waren unter Salzstress um ca. die Hälfte kleiner als unter Kontrollbedingungen (Gleichung: 2.11).

Ein weiterer Weg zur Ermittlung des Verhältnisses der Zellgröße besteht in der Berechnung aus der Zellwandextensibilität (Kap. 2.13.1). Beim Vergleich der Abnahme des Zellvolumens, errechnet aus der Zellwandextensibilität (Gleichung: 2.13) und der Abnahme der DNA-Konzentration (Gleichung: 2.11), konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (Abb. 4.1). Beide Methoden führten zum selben Ergebnis und sollten somit zuverlässig sein.

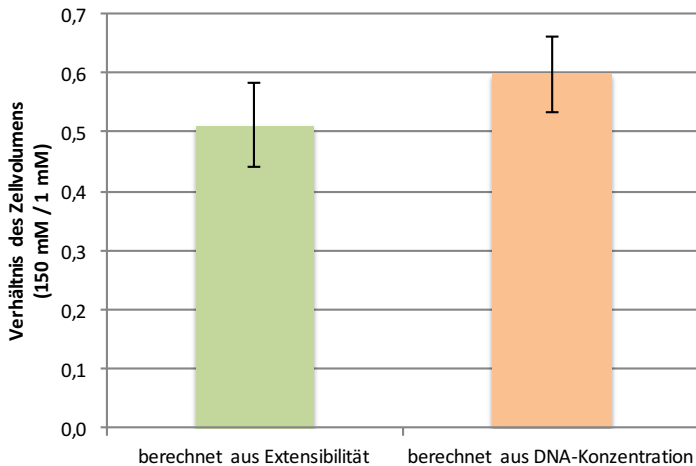


Abbildung 4.1: Vergleich der Verhältnisse des Zellvolumens 150 mM/1 mM NaCl im Spross von Pioneer 3906 nach 21 Tagen Wachstum mit 7 Tagen 1 mM bzw. 150 mM NaCl. Errechnet aus Extensibilität und DNA-Konzentration.

Bei der Messung der Zellwandextensibilität muss jedoch beachtet werden, dass mit der hier genutzten Methode, die Extensibilität auf Gewebeebene gemessen wird. Somit ist die gemessene Extensibilität des gemessenen Gewebestückes, neben der eigentlichen Extensibilität der Zellwand, auch durch die Anzahl der Zellwände beeinflusst. Aus diesem Grund wurde aus dem mittels DNA-Konzentration gemessenen Zellvolumen, die Veränderung der Menge der Zellwände in den gemessenen Blattsegmenten rechnerisch ermittelt (Kap. 4.2.1).

Ein so bisher nicht beachteter Faktor liegt darin, dass durch das verminderte Zellvolumen mehr Zellen in den für die Messung der Zellwandextensibilität verwendeten Blattsegmenten ein erhöhter Anteil an Zellwänden vorliegen könnte. Die Extensibilität könnte durch einen erhöhten Zellwandanteil vermindert und die Ergebnisse der Messung verfälscht sein.

4.2.1 Berechnung des Zellwandanteils in Gewebesegmenten

Eine Zelle kann als Zylinder angenommen werden, der durch eine Höhe (h) und einen Radius (r) bestimmt ist. Eine Volumenveränderung führt zu einer Veränderung von h und r . Bei einer Veränderung des Zellvolumens kommt es somit zu einer Veränderung der Zellzahl in den zur Messung der Zellwandextensibilität entnommenen Blattsegmenten, da diese immer mit der gleichen Länge und Breite entnommen wurden.

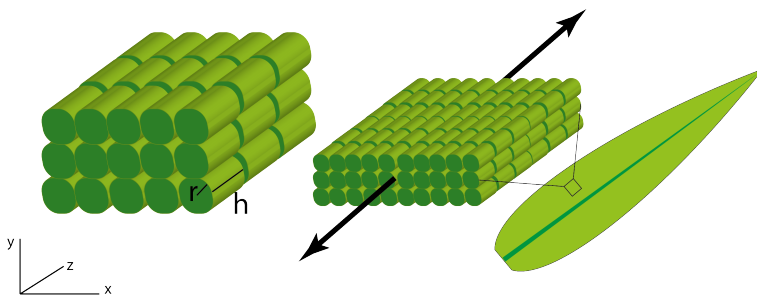


Abbildung 4.2: Schema der Größenveränderung in Blattsegmenten. x : Segmentbreite, y : Blattdicke, z : Segmentlänge, Pfeile: Zugrichtung

Hierbei gilt zu beachten, dass nur Veränderungen im Querschnitt des Segments ($x \times y$) zum Tragen kommen. Die Summe der in die Messung einfließenden Zellwände in Längsrichtung (z) ist auf Grund der immer gleichen Länge der entnommenen Blattsegmente konstant. Änderungen in der Anzahl der Zellen führen somit zu keiner Veränderung der rheologischen Eigenschaften in Längsrichtung. Somit ist die Messung unabhängig vom Verhältnis von r zu h , da die Messung nur durch die Menge der Zellwände im Querschnitt des Segments beeinflusst wird. Veränderungen von h wirken sich somit nicht auf die Messung der Extensibilität der Zellwand aus.

Auf der Breite des Segments (x) variiert die Anzahl der Zellen, da die Breite des Segments immer gleich gewählt wurde, der Zellradius (r) aber verändert ist. Die Anzahl der Zellen in Richtung der Dicke des Blattsegmentes

(y) sollte unter Salzstress konstant sein. Eine Verdickung des Blattes während des Wachstums ist äußerst unwahrscheinlich, da mehr Zellen durch vermehrte Zellteilung vorhanden sein müssten. Hiergegen sprechen die Daten aus der Zellanzahl im Spross (Abb. 3.38) nahe. Es konnte eine Verminderung in der Anzahl der Zellen beobachtet werden und somit kann eine Verdickung der Blätter durch eine erhöhte Zellzahl ausgeschlossen werden. Diese Annahme wird durch mikroskopische Messungen zu Zelldimensionen unter Salzstress von Zörb *et al.* (2015) gestützt. Eine Verdickung der Blätter kann nach Abschluss des Wachstums beobachtet werden (Munns & Tester 2008). Dies kann durch die Auflagerung der Sekundärwand auf die Primärwand erklärt werden. Durch die Auflagerung der Sekundärwand, welche hauptsächlich aus Cellulosemikrofibrillen besteht, werden die Zellwände in ihrer endgültigen Form verfestigt (Cosgrove & Jarvis 2012). In den gemessenen Geweben war die Cellulosekonzentration jedoch nicht erhöht (3.14, 3.34) (Uddin *et al.* 2013) und somit das Wachstum noch nicht abgeschlossen. Die Zellzahl im Querschnitt eines Blattsegments ($x \times y$) ist durch folgende Formel zu ermitteln:

$$n_{\text{Querschnitt}} = n_{\text{Segmentdicke}} \times n_{\text{Segmentbreite}} \quad (4.1)$$

n: Anzahl der Zellen; die Anzahl der Zellen in der Segmentdicke (y) ist konstant, in der Segmentbreite (x) variabel

Die Summe der gemessenen Zellwände wird durch den Umfang der Zellen bestimmt. Hierfür gilt die Formel:

$$U_{\text{Zelle}} = 2\pi r_{\text{Zelle}} \quad (4.2)$$

U: Umfang, r: Radius

Die Summe der auf die Extensibilität wirkenden Zellwände wurde mit folgender Formel berechnet:

$$ZW_{\text{Querschnitt}} = n_{\text{Querschnitt}} \times U_{\text{Zelle}} \quad (4.3)$$

ZW: Summe der Zellwände, n: Anzahl der Zellen, U: Umfang

4 Diskussion

Bei einer Verminderung des Zellvolumens, vermindert sich der Radius (r) der Zellen um den Faktor f . Somit erhöht sich die Anzahl der Zellen (n) um den Faktor $1/f$, während sich der Umfang (U) um den Faktor f vermindert.

$$ZW_{\text{Querschnitt}2} = \frac{n_{\text{Querschnitt}}}{f} \times U f \quad (4.4)$$

ZW: Summe der Zellwände, n : Anzahl der Zellen, r : Zellradius, f :
Veränderungsfaktor

Wie man sieht, kann der Faktor f gekürzt werden. Eine Veränderung des Zellvolumens führt nicht zu einer Veränderung der Zellwandsumme im Querschnitt der gemessenen Blattsegmente, da sich Zellanzahl und Zellumfang gegenseitig ausgleichen. Anders ausgedrückt: Ist die Anzahl der Zellen in der Blattdicke konstant, ist der Anteil der Zellwände im Querschnitt unabhängig von der Anzahl der Zellen in der Segmentbreite konstant. Somit ist die Zellwandsumme des Segmentquerschnitts unabhängig von einer Veränderung des Zellvolumens. Eine Veränderung des Zellvolumens hat keinen Einfluss auf die gemessene Zellwandextensibilität des Gewebes.

Pioneer 3906 zeigte unter Salzstress der ersten Phase mit 150 mM NaCl eine Verminderung der Frischmasse auf 35,2% im Vergleich mit der Variante 1 mM NaCl (Abb. 3.30). Die Zellzahl war um 39,4% und die Zellwandextensibilität um 21,9% vermindert. Nach der Berechnung des Zellvolumens auf Basis der Zellwandextensibilität (Kap. 2.5.1) erhält man eine Verminderung des Zellvolumens von 51,1%. Somit waren unter Salzstress auf Grund verminderter Zellteilung weniger Zellen vorhanden und diese auf Grund der verminderten Zellwandextensibilität zusätzlich kleiner. Hieraus folgt eine errechnete Verminderung der Frischmasse durch 150 mM NaCl auf 32,4% des Wertes der Variante mit 1 mM NaCl. Dieser Wert entsprach, im Rahmen der Standardfehler, der direkt gemessenen Verminderung der Frischmasse (Abb. 4.3). Die Frischmassereduktion von Pioneer 3906 unter Salzstress der 1. Phase kann somit durch die kombinierte Verminderung von Zellteilung und Zellwandextensibilität erklärt werden.

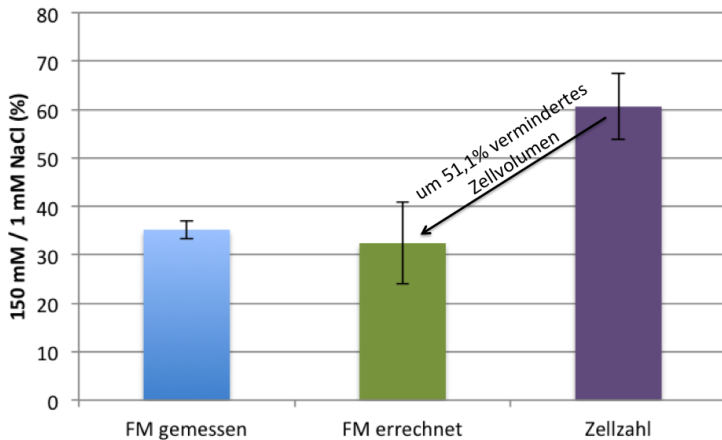


Abbildung 4.3: Gemessene Frischmasse und aus Zellzahl und Zellvolumenabnahme errechnete Frischmasse von Pioneer 3906 nach 21 Tagen Wachstum mit 7 Tagen 1 mM bzw. 150 mM NaCl.

Ein weiterer Hinweis auf eine verminderte Zellteilung kann in der Reaktion von Pioneer 3906 auf 100 mM NaCl mit einer erhöhten Calciumkonzentration in der Nährlösung gefunden werden. Während die Zellwandextensibilität (Abb. 3.11) und die Blattlängenzunahmerate (Abb. 3.10) durch die zusätzliche Calciumumgäbe wieder hergestellt werden konnten, war die Sprossfrischmasse nicht analog hierzu beeinflusst (Abb. 3.8). Somit stellt eine erhöhte Calciumkonzentration unter Salzstress zwar das Streckungswachstum wieder her, jedoch scheint die zur Frischmassebildung benötigte Zellteilung nicht beeinflusst zu sein.

4.2.2 1. Hypothese: Salzstress der ersten Phase führt zu einer verminderten Zellteilung

Die Zellteilung des Genotypen Pioneer 3906 war unter Salzstress der ersten Phase gegenüber Pflanzen unter Kontrollbedingungen signifikant vermindert.

Die Messung des DNA-Gehaltes im Spross und die Messung der Zellwandextensibilität kamen zum gleichen Ergebnis.

4.3 Turgorschwellenwert

Der Turgorschwellenwert (Y) beschreibt den Wert, den der Turgor (Ψ_p) überschreiten muss, um eine plastische Verformung der Zellwand zu ermöglichen (Lockhart 1965). Unterhalb dieses Wertes reicht der Turgor nicht aus, um die Zellwand plastisch zu dehnen. Hierbei gilt, dass die Zellwand bei $\Psi_p \leq Y$ nur elastisch verformt wird. Sobald der Turgor entfernt wird, geht die Zelle in die ursprüngliche Form zurück. Wenn $\Psi_p = Y$ ist die Zellwand voll elastisch gespannt. Somit ist Y auch ein Maß für die Elastizität der Zellwand.

Dieser Zusammenhang wird genutzt, um Y auf einem anderen Weg als dem in dieser Arbeit genutzten zu bestimmen. Hierfür wird Ψ_p in Einzelzellen eines von der Wasserversorgung getrennten Gewebesegementes über einen längeren Zeitraum gemessen. Durch die fehlende Wasserversorgung sinkt Ψ_p so lange bis kein Wachstum der Zelle mehr stattfindet und bleibt dann konstant. Der so ermittelte Wert entspricht Y (Cosgrove 1993b). Die hier genutzte Methode verfolgt den umgekehrten Ansatz zur Messung von Y .

Je größer Y , desto elastischer die Zellwand und desto kleiner der wachstumswirksame Turgor. Eine erhöhte Calciumkonzentration in der Nährlösung von Mais führte zu einer Verminderung von Y (Abb. 3.12) und somit der elastischen Dehnbarkeit der Zellwand. Hierzu könnte es durch die vermehrte Ausbildung von Calciumbrücken in der Pectinmatrix und einer damit einhergehenden Versteifung des Pectins kommen (Taiz & Zeiger 2006). Durch die erhöhte Steifigkeit des Pectins sollte es bereits bei einem geringeren Turgor zu einer plastischen Verformung der Zellwand kommen, da es zu einer Verminderung der Elastizität kommt (Garnier *et al.* 1993; Jarvis 1984; Rojas *et al.* 2011). Somit sollte bei gleichem Turgor der wachstumswirksame Turgor ($\Psi_p - Y$) erhöht sein.

Weiterhin ist die Wachstumsreaktion bei einem normal hohen Turgor nicht durch den wachstumswirksamen Turgor begrenzt. Hierbei wird davon ausgegangen, dass das maximale Wachstum von einer Obergrenze der mögli-

chen Scherung der Zellwandpolymere begrenzt wird, welche abhängig von der Zellwandextensibilität ist (Cosgrove 1993b). Solange der wachstumswirksame Turgor ein gewisses Niveau, durch die Veränderung von Y und Ψ_p , nicht unterschreitet, wirkt nur die Extensibilität der Zellwand begrenzend (Cosgrove 1993b), welche getrennt von Y betrachtet werden muss (Abb. 4.4). Bei Pioneer 3906 konnte kein Einfluss von Salzstress auf Y festgestellt werden (Abb. 3.12), während die Zellwandextensibilität signifikant verändert wurde (Abb. 3.6, 3.11 und 3.33).

Cramer *et al.* (1991) konnten für Pioneer 3906 eine Erhöhung von Y unter Salzstress zeigen. Hierbei ist jedoch zu beachten, dass die Messungen bereits 24 h nach Applikation des Salzstress durchgeführt wurden und sich die Pflanzen noch in der Anpassung an den applizierten Salzstress befanden. Weiterhin wurden die Pflanzen direkt der vollen NaCl-Konzentration von bis zu 120 mM ausgesetzt. Die hier beobachteten Effekte scheinen somit transients Natur, nach einem extremen osmotischen Schock zu sein und sind somit der Phase 0 zuzuordnen (Schubert 2011). Weitere arbiträre Effekte bei Cramer *et al.* könnten mit dem Fehlen eines Tag-/Nachtprogrammes und dem geringen Alter der Pflanzen (7 Tage) erklärt werden.

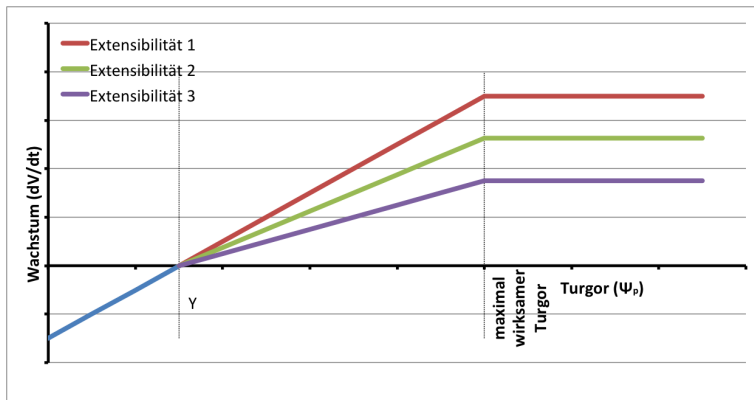


Abbildung 4.4: Zusammenhang von Turgor, Turgorschwellenwert und Extensibilität der Zellwand in Bezug auf die Wachstumsrate (nach Cosgrove 1993a)

4.3.1 2. Hypothese: Salzstress der ersten Phase erhöht den Turgorschwellenwert der wachsenden Zellwand des Maisgenotypen Pioneer 3906

Diese Hypothese konnte widerlegt werden. Unter Salzstress der ersten Phase erfährt der Turgorschwellenwert bei Pioneer 3906 keine Veränderung. Somit hat der Turgorschwellenwert keinen Einfluss auf die Wachstumsminderung unter Salzstress.

4.4 Extensibilität der wachsenden Zellwand unter Salzstress

Neben der verzögerten Pflanzenentwicklung ist das Streckungswachstum von Mais unter Salzstress der ersten Phase eingeschränkt (Munns & Tester 2008). Die Veränderungen der Zellwandextensibilität stehen in enger Verbindung mit der apoplastischen Ansäuerung (Van Volkenburgh & Boyer 1985; Pitann *et al.* 2009). Hierbei ist besonderes Augenmerk auf die Expansine zu legen (Cosgrove 2000a). Diese werden durch einen verminderten pH-Wert im Apoplasten aktiviert und beginnen Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Cellulose und Hemicellulose aufzubrechen. Hierdurch kommt es zu einer erhöhten Zellwandextensibilität (Cosgrove 2000b). Pioneer 3906 zeigt unter Salzstress der ersten Phase bei einem verminderten Streckungswachstum eine verminderte Ansäuerung, während der salzresistente Genotyp SR 03 das Wachstum und die Ansäuerung aufrecht erhält (Pitann *et al.* 2009). Dieses Ergebnis konnte wiederholt und für weitere Genotypen gezeigt werden (Abb. 3.2). Die Extensibilität der Zellwand (Abb. 3.6) reagierte analog zur Ansäuerung des Apoplasten bei den Genotypen Pioneer 3906, SR 03, SWS X, SWS 164 und NaExII (Abb. 3.2). Der Genotyp SWS 47 zeigte jedoch ein abweichendes Verhalten. Obwohl er unter Salzstress die Ansäuerung des Apoplasten aufrecht erhielt (Abb. 3.2), war die Extensibilität seiner Zellwand vermindert (Abb. 3.6). Erst im Kreuzungsprodukt SR 03, durch die Kreuzung mit NaExII, konnten sowohl die Ansäuerung des Apoplasten (Abb. 3.2) und Extensibilität der Zellwand (Abb. 3.6) unter Salzstress der ersten Phase aufrecht erhalten werden.

4.4 Extensibilität der wachsenden Zellwand unter Salzstress

Möglicherweise wird die Eigenschaft der aufrecht erhaltenen Zellwandextensibilität unter Salzstress durch NaExII vererbt. Hiergegen spricht jedoch, dass der Genotyp DSR 5, dessen Vater auch NaExII ist, eine verminderte Zellwandextensibilität unter Salzstress (Abb. 3.33), trotz der Aufrechterhaltung der apoplastischen Ansäuerung (Tab. 3.2) zeigte. Zusätzlich zeigt die Kreuzung von SWS 164 \times SWS 47 (SWS X), dass auch die Kombination von Linien mit verminderter Extensibilität zu einer Verbesserung dieses Merkmals führen kann (Abb. 3.6). Auf Grund der Ergebnisse von SWS 47, NaExII und dem daraus folgenden Kreuzungsprodukt SR 03 (Abb. 3.6, 3.2) wäre ein dominanter Erbgang, in Bezug auf dieses Merkmal, denkbar gewesen. Für die Vererbung der Zellwandextensibilität scheint mehr als nur ein Gen verantwortlich zu sein. Dieses Ergebnis unterstreicht den polygenen Charakter der Resistenz in der ersten Phase des Salzstress (Schubert 2011). Der Genotyp DSR 5 zeigt wiederum, dass für eine Resistenz in der ersten Phase des Salzstress die Ansäuerung des Apoplasten nicht zwingend erforderlich ist (Hatzig *et al.* 2010).

4.4.1 3. Hypothese: Salzstress der ersten Phase vermindert generell die Extensibilität der wachsenden Zellwand in Mais

Die Extensibilität der Zellwand ist nicht bei allen getesteten Maisgenotypen unter Salzstress vermindert. Hierbei konnte auch keine Unterscheidung zwischen empfindlichen und resistenten Genotypen getroffen werden. Somit konnte diese Hypothese widerlegt werden. Für eine verbesserte Resistenz unter Salzstress ist eine aufrecht erhaltene Extensibilität der Zellwand nicht zwingend notwendig.

Einen weiteren Faktor stellt die Arabinosekonzentration in der Hemicellulose der Zellwand dar. Hierbei wird davon ausgegangen, dass eine Erhöhung der Arabinosekonzentration die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen und somit die Stärke der Verbindung zwischen Cellulose und Hemicellulose vermindert (Gibeaut & Carpita 1991). Hierdurch sollte es zu einer Erhöhung der Zellwandextensibilität kommen. In vorangegangenen Experimenten

4 Diskussion

konnte gezeigt werden, dass SR 12 unter Salzstress eine Erhöhung der Arabinosekonzentration unter Salzstress der ersten Phase zeigt (Uddin *et al.* 2013; Uddin *et al.* 2014), während die Ansäuerung des Apoplasten nicht aufrechterhalten werden konnte (Abb. 3.2) (Hatzig *et al.* 2010).

Eine erhöhte Arabinosekonzentration könnte somit zu einer Aufrechterhaltung der Zellwandextensibilität unter Salzstress der ersten Phase führen. DSR 5, welcher unter Salzstress der ersten Phase eine verbesserte Resistenz (Abb. 3.21, 3.31) aufweist, reagiert anders als erwartet. Zwar war die Ansäuerung des Apoplasten unter Salzstress der ersten Phase aufrecht erhalten (Tab. 3.2) und zusätzlich die Konzentration der Arabinose erhöht worden (Abb. 3.35), dennoch war bei diesem Genotypen die Extensibilität der Zellwand signifikant vermindert (Abb. 3.33). Sowohl die apoplastische Ansäuerung als auch die Erhöhung der Arabinosekonzentration führten nicht zwangsläufig zu einer verbesserten Zellwandextensibilität unter Salzstress. Somit müssen weitere Faktoren auf die Zellwandextensibilität unter Salzstress wirken. Die Erhöhung der Arabinosekonzentration in der Zellwand führt zwar zu einer Verminderung der Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Hemicellulose und Cellulose (Gibeaut & Carpita 1991). Es kann aber eine Veresterung mit Ferulasäuren erfolgen, die eine stärkere Vernetzung der Zellwand zur Folge haben können (Bunzel 2009). Somit könnte eine erhöhte Arabinosekonzentration in Kombination mit einer erhöhten Konzentration an vernetzenden Ferulasäuren zu einer verminderten Zellwandextensibilität führen.

Neben der Ansäuerung des Apoplasten und der Erhöhung der Arabinosekonzentration, kann auch die Konzentration der Expansine in der Zellwand eine entscheidende Rolle in der Veränderung der Zellwandextensibilität unter Salzstress spielen. Durch die Erhöhung der Expansinkonzentration wird bei gleichem pH-Wert, die Zellwand stärker aufgeweicht (Cosgrove 2000b). Der salzresistente Genotyp SR 03 zeigte im Gegensatz zu dem salzempfindlichen Genotypen Lector eine aufrecht erhaltene Konzentration von wachstumsstimulierenden β -Expansinen (Geilfus *et al.* 2011).

4.4.2 Hypothese 4: Die Kombination von aufrecht erhaltener apoplastischer Ansäuerung und gleichzeitiger Erhöhung der Arabinosekonzentration in der Zellwand führt zu einer verbesserten Extensibilität der Zellwand in der ersten Phase des Salzstresses

Der Genotyp DSR 5 zeigte unter Salzstress eine aufrecht erhaltene Ansäuerung des Apoplasten und eine erhöhte Konzentration der Arabinose in der Zellwand. Dennoch war die Extensibilität seiner Zellwand durch Salzstress vermindert. Die Kombination dieser beiden Parameter führte hier nicht zur Verbesserung der Zellwandextensibilität. Deshalb kann diese Hypothese nicht aufrecht erhalten werden.

4.5 Einfluss von Calcium auf das Wachstum unter Salzstress

Bei den Wurzeln von Baumwolle konnte durch eine erhöhte Gabe von Calcium unter Salzstress der ersten Phase eine Wiederherstellung des Streckungswachstums und der Extensibilität erreicht werden (Zhong & Läuchli 1988). Weiterhin wurde die verminderte Cellulosekonzentration unter Salzstress wieder auf das Niveau der Kontrolle angehoben (Zhong & Läuchli 1988). Auf Grund dieser Ergebnisse wurde vermutet, dass eine verminderte Cellulosekonzentration zu einer Einschränkung der Zellwandextensibilität unter Salzstress führt. Hierbei könnte es durch die Veränderung des Verhältnisses Cellulose zu Hemicellulose zu einer stärkeren Vernetzung kommen. Eine Verminderung der Cellulosekonzentration konnte für die Maisgenotypen Pioneer 3906 und SR 03 gezeigt werden (Uddin *et al.* 2013). Während die Zellwandextensibilität bei Pioneer 3906 eingeschränkt war, war SR 03 in diesem Parameter unter Salzstress der ersten Phase unverändert (Abb. 3.6). Diese Diskrepanz könnte durch eine Überlagerung dieses Effektes durch die verbesserte Ansäuerung des Apoplasten in SR 03 und der damit einhergehenden Aktivität

der Expansine zu erklären sein (Cosgrove 2000b).

Eine Gabe von zusätzlichem Calcium unter Salzstress der ersten Phase führte zur Wiederherstellung der Zellwandextensibilität (Abb. 3.11) und der Wachstumsrate von Pioneer 3906 (Abb. 3.10), jedoch war die Cellulosekonzentration weiterhin vermindert (Abb. 3.14). Trotz der wiederhergestellten Zellwandextensibilität und Wachstumsrate war die Sprossfrischmasse durch die erhöhte Calciumkonzentration unbeeinflusst (Abb. 3.8). Diese Ergebnisse zeigen, dass die Ergebnisse von Baumwollwurzeln sich nicht auf den Maisspross übertragen lassen. Die Zellwandextensibilität reagierte im Maisspross unabhängig von der Cellulosekonzentration. Dass die Sprossfrischmasse trotz zusätzlicher Calciumgabe weiterhin vermindert war, könnte durch die verminderte Zellteilung unter Salzstress erklärt werden (Kap. 4.2.2): Zwar wurde das Streckungswachstum durch Calcium wiederhergestellt (Abb. 3.10), jedoch konnte auf Grund der verminderten Zellteilung nicht die ursprüngliche Sprossfrischmasse wiederhergestellt werden (3.8).

4.5.1 5. Hypothese: Eine Verminderung der Cellulosekonzentration führt zu einer verminderten Zellwandextensibilität

Durch Salzstress der ersten Phase wird die Cellulosekonzentration im Spross von Mais vermindert. Weiterhin kommt es bei dem Genotypen Pioneer 3906 in dieser Phase zu einer Verminderung der Zellwandextensibilität. Jedoch konnte durch eine erhöhte Gabe von Calcium die Zellwandextensibilität wiederhergestellt werden, während die Cellulosekonzentration unverändert niedrig war. Somit ist diese Hypothese zu verwerfen.

Durch die erhöhte Calciumgabe unter Salzstress konnte die erhöhte Pectinkonzentration (Abb. 3.15) und die der freien Carboxylgruppen des Pectins (Abb. 3.16) auf das Niveau der Salzvariante ohne zusätzliches Calcium abgesenkt werden. Pectin bildet in der Zellwand eine gelförmige Matrix, welche durch Calcium an ihren freien Carboxylgruppen vernetzt wird (Jarvis 1984). Somit sollte eine erhöhte Konzentration von Pectin mit mehr freien Carboxylgruppen zu einer Versteifung der Zellwand unter Salzstress führen, welche durch eine erhöhte Calciumgabe wieder relativiert werden kann.

4.5 Einfluss von Calcium auf das Wachstum unter Salzstress

Weiterhin führt Salzstress zu einer Erhöhung der Konzentration von Arabino-
se, Rhamnose, Galactose und Mannose in der Hemicellulose (3.17), während
die Konzentration der Hemicellulose in allen Varianten konstant blieb (Abb.
3.17). Diese Monomere bilden die Seitenketten der Hemicellulose, welche die
verschiedenen Zellwandbestandteile vernetzen können (Carpita & McCann
2006). Diese Erhöhung von Vernetzungspartnern könnte zu einer Verstei-
fung der Zellwand unter Salzstress führen. Die erhöhte Calciumgabe unter
Salzstress führte zu einer Normalisierung der Konzentrationen auf das Niveau
der Kontrolle (3.17). Sollte die Zellwand durch die Erhöhung der Konzentration
der Seitenketten der Hemicellulose unter Salzstress versteift werden, konnte
dieser Effekt durch die erhöhte Calciumgabe neutralisiert werden.

Literatur

- Bunzel, M.: Chemistry and occurrence of hydroxycinnamate oligomers. *Phytochem. Rev.* **9**, 47–64 (2009).
- Carpita, N. C.: Structure and Biogenesis of the Cell Walls of Grasses. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **47**, 445–476 (1996).
- Carpita, N. C., Brown, R. a. & Weller, K. M.: Uptake and Metabolic Fate of Glucose, Arabinose, and Xylose by *Zea mays* Coleoptiles in Relation to Cell Wall Synthesis. *Plant Physiol.* **69**, 1173–80 (1982).
- Carpita, N. C. & McCann, M. In: *Biochem. Mol. Biol. plants* 6. Aufl. 52–108 American Society of Plant Physiologists, Rockville, Maryland (2006).
- Chalyk, S. T.: Properties of maternal haploid maize plants and potential application to maize breeding. *Euphytica* **79**, 13–18 (1994).
- Cosgrove, D. J.: Expansive growth of plant cell walls. *Plant Physiol. Biochem.* **38**, 109–24 (2000).
- Cosgrove, D. J.: Loosening of plant cell walls by expansins. *Nature* **407**, 321–6 (2000).
- Cosgrove, D. J.: Characterization of long-term extension of isolated cell walls from growing cucumber hypocotyls. *Planta* **177**, 121–130 (1989).
- Cosgrove, D. J.: Do Plant Cell Walls Extend? *Plant Physiol.* **102**, 1–6 (1993).
- Cosgrove, D. J.: Growth of the plant cell wall. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**, 850–61 (2005).

- Cosgrove, D. J.: Tansley Review No. 46 Wall extensibility: Its nature, measurement and relationship to plant cell growth. *New Phytol.* **124**, 1–23 (1993).
- Cosgrove, D. J. & Jarvis, M. C.: Comparative structure and biomechanics of plant primary and secondary cell walls. *Front. Plant Sci.* **3**, 1–6 (2012).
- Cramer, G. R. & Bowman, D.: Kinetics of maize leaf elongation - I. Increased yield threshold limits short-term, steady-state elongation rates after exposure to salinity. *J. Exp. Bot.* **42**, 1417–1426 (1991).
- Cramer, G. R., Schmidt, C. L. & Bidart, C.: Analysis of cell wall hardening and cell wall enzymes of salt-stressed maize (*Zea mays*) leaves. *Aust. J. Plant Physiol.* **28**, 101–109 (2001).
- De Costa, W., Zörb, C., Hartung, W. & Schubert, S.: Salt resistance is determined by osmotic adjustment and abscisic acid in newly developed maize hybrids in the first phase of salt stress. *Physiol. Plant.* **131**, 311–21 (2007).
- Deimling, S., Röber, F. K. & Geiger, H. H.: Methodik und Genetik der in-vivo-Haploideninduktion bei Mais. *Vor. für Pflanzenzüchtung* **38**, 203–224 (1997).
- Durachko, D. M. & Cosgrove, D. J.: Measuring plant cell wall extension (creep) induced by acidic pH and by alpha-expansin. *J. Vis. Exp.* doi:10.3791/1263 (2009).
- Eitenmüller, P. T.: Einfluss von Salzstress auf die Zusammensetzung der Zellwand in zwei salzresistenten Maisgenotypen (SR 03 und SR 12). Masterarbeit am Institut für Pflanzenernährung der Justus-Liebig-Universität Gießen (2011).
- Evans, M. L. & Ray, P. M.: Timing of the auxin response in coleoptiles and its implications regarding auxin action. *J. Gen. Physiol.* **53**, 1–20 (1969).

Literatur

- FAO: Salt-affected soils <<http://www.fao.org/soils-portal/soil-management/management-of-some-problem-soils/salt-affected-soils/more-information-on-salt-affected-soils/en/>>.
- Filisetti-Cozzi, T. M. C. C. & Carpita, N. C.: Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars. *Anal. Biochem.* **197**, 157–162 (1991).
- Fortmeier, R. & Schubert, S.: Salt tolerance of maize (*Zea mays* L.): The role of sodium exclusion. *Plant Cell Environ.* **18**, 1041–1047 (1995).
- Fry, S. C.: The growing plant cell wall: Chemical and metyabolic analysis, Blackburn Press, Caldwell, USA (2006).
- Garnier, C., a.V. Axelos, M. & Thibault, J.-F.: Phase diagrams of pectin-calcium systems: Influence of pH, ionic strength, and temperature on the gelation of pectins with different degrees of methylation. *Carbohydr. Res.* **240**, 219–232 (1993).
- Geiger, H. H. In: *Handb. Maize - Vol. II Genet. Genomics 1. Aufl.* (Hrsg. Bennetzen, J. L. & Hake, S.) 641–657 Springer Verlag, New York (2009).
- Geilfus, C.-M., Zörb, C., Neuhaus, C., Hansen, T., Lüthen, H. & Mühling, K. H.: Differential Transcript Expression of Wall-loosening Candidates in Leaves of Maize Cultivars Differing in Salt Resistance. *J. Plant Growth Regul.* **30**, 387–395 (2011).
- Gibeaut, D. M. & Carpita, N. C.: Tracing cell wall biogenesis in intact cells and plants : Selective turnover and alteration of soluble and cell wall polysaccharides in grasses. *Plant Physiol.* **97**, 551–61 (1991).
- Goldberg, R. In: *Mod. methods plant Anal. Cell components 1. Aufl.* (Hrsg. Linskens, H.-F. & Jackson, J. F.) 1–30 Springer-Verlag, Berlin (1985).

- Hager, A.: Role of the plasma membrane H⁺-ATPase in auxin-induced elongation growth: Historical and new aspects. *J. Plant Res.* **116**, 483–505 (2003).
- Hallauer, A. R. In: *Handb. Plant Breed.* 2. Aufl. (Hrsg. Hallauer, A. R. & Carena, M. J.) 3–98 Springer Verlag, (2009).
- Hallauer, A. R., Carena, M. J. & Filho, J. M.: *Quantitative Genetics in Maize Breeding*, 3. Aufl., New York (2010).
- Hatzig, S., Hanstein, S. & Schubert, S.: Apoplast acidification is not a necessary determinant for the resistance of maize in the first phase of salt stress. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* **173**, 559–562 (2010).
- Hecht-Buchholz, C.: Wirkung der Mineralstoffernahrung auf die Feinstruktur der Pflanzenzelle. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* **132**, 45–68 (1972).
- Heß, D.: *Pflanzenphysiologie*, 11. Aufl., 265–272 Eugen Ulmer KG, Stuttgart (2008).
- Hütsch, B. W., Jung, S. & Schubert, S.: Comparison of Salt and Drought-Stress Effects on Maize Growth and Yield Formation with Regard to Acid Invertase Activity in the Kernels. *J. Agron. Crop Sci.* doi:10.1111/jac.12111 (2014).
- Jarvis, M. C.: Structure and properties of pectin gels in plant cell walls. *Plant, Cell Environ.* **7**, 153–164 (1984).
- Koyro, H.-W.: Ultrastructural and physiological changes in root cells of sorghum plants (*Sorghum bicolor* x *S. sudanensis* cv. Sweet Sioux) induced by NaCl. *J. Exp. Bot.* **48**, 693–706 (1997).
- Lockhart, J. A.: An analysis of irreversible plant cell elongation. *J. Theor. Biol.* **8**, 264–75 (1965).

- Lutz, K. a., Wang, W., Zdepski, A. & Michael, T. P.: Isolation and analysis of high quality nuclear DNA with reduced organellar DNA for plant genome sequencing and resequencing. *BMC Biotechnol.* **11**, 54 (2011).
- McCann, M. C., Wells, B. & Roberts, K.: Direct visualization of cross-links in the primary plant cell wall. *J. Cell Sci.* **96**, 323–334 (1990).
- Munns, R.: Physiological processes limiting plant growth in saline soils: Some dogmas and hypotheses. *Plant Cell Environ.* **16**, 15–24 (1993).
- Munns, R. & Tester, M.: Mechanisms of salinity tolerance. *Annu. Rev. Plant Biol.* **59**, 651–81 (2008).
- Neubert, A., Zörb, C. & Schubert, S. In: *Plant Nutr. Food Secur. Hum. Heal. Environ. Prot.* (Hrsg. Li, C. J.) 544–545 Tsinghua University Press, Beijing, China (2005).
- Peharec Štefanić, P., Koffler, T., Adler, G. & Bar-Zvi, D.: Chloroplasts of salt-grown *Arabidopsis* seedlings are impaired in structure, genome copy number and transcript levels. *PLoS One* **8**, e82548 (2013).
- Pitann, B., Schubert, S. & Mühling, K. H.: Decline in leaf growth under salt stress is due to an inhibition of H⁺-pumping activity and increase in apoplastic pH of maize leaves. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* **172**, 535–543 (2009).
- Qadir, M., Noble, A. D., Schubert, S., Thomas, R. J. & Arslan, A.: Sodicity-induced land degradation and its sustainable management: Problems and prospects. *L. Degrad. Dev.* **17**, 661–676 (2006).
- Richter, G.: *Stoffwechselphysiologie der Pflanzen*, 6. Aufl., Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1998).
- Rojas, E. R., Hotton, S. & Dumais, J.: Chemically mediated mechanical expansion of the pollen tube cell wall. *Biophys. J.* **101**, 1844–53 (2011).

- Rotarencu, V., Dicu, G. & Sarmaniuc, M.: Induction of maternal haploids in maize. *Maize Genet. Coop. Newsl.* **83**, 15–17 (2009).
- Schopfer, P.: *Experimentelle Pflanzenphysiologie*, 2. Aufl., Springer-Verlag, Berlin (1989).
- Schopfer, P. & Brennicke, A.: *Pflanzenphysiologie*, 7. Aufl., Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg (2010).
- Schubert, S.: *Pflanzenernährung: Grundwissen Bachelor*, UTB-Verlag, Ulm (2006).
- Schubert, S. In: *The Molecular and Physiological Basis of Nutrient Use Efficiency in Crops* 1. Aufl. (Hrsg. Hawkesford, M. J. & Barraclough, P.) 433–455 John Wiley & Sons, Inc., (2011).
- Schubert, S., Neubert, A., Schierholt, A., Sümer, A. & Zörb, C.: Development of salt-resistant maize hybrids: The combination of physiological strategies using conventional breeding methods. *Plant Sci.* **177**, 196–202 (2009).
- Schubert, S. In: *Stoffumsatz im wurzelnahen Raum*. 9. Borkheider Semin. zur Ökophysiologie des Wurzelraumes. (Hrsg. Merbach, W., Wittenmayer, L. & Augustin, J.) 74–79 B. G. Teubner, Stuttgart, Leipzig (1999).
- Schubert, S. & Läuchli, A.: Metabolic Dependence of Na⁺ Efflux from Roots of Intact Maize Seedlings. *J. Plant Physiol.* **133**, 193–198 (1988).
- Schwedt, G. & Vogt, C. In: *Anal. Trennmethode*n 97–141 Wiley-VCH Verlag, Weinheim (2010).
- Steffens, D. & Schubert, S.: *Agrikulturchemisches Praktikum*, Verlag Ulrich E. Grauer, Beuren (2004).
- Sümer, A., Zörb, C., Yan, F. & Schubert, S.: Evidence of sodium toxicity for the vegetative growth of maize (*Zea mays* L.) during the first phase of salt stress. *J. Appl. Bot.* **78**, 135–139 (2004).

Literatur

- Taiz, L. & Zeiger, E.: *Plant Physiology*, 4. Aufl., Sinauer Associates, Sunderland (2006).
- Termaat, A., Passioura, J. & Munns, R.: Shoot turgor does not limit shoot growth of NaCl-affected wheat and barley. *Plant Physiol.* **77**, 869–872 (1985).
- Uddin, M. N., Hanstein, S., Leubner, R. & Schubert, S.: Leaf cell-wall components as influenced in the first phase of salt stress in three maize (*Zea mays* L.) hybrids differing in salt resistance. *J. Agron. Crop Sci.* **199**, 405–415 (2013).
- Uddin, M. N. *Effect of salinity in the first phase of salt stress on leaf cell-wall components with special reference to cell-wall extensibility* Diss. (2012).
- Uddin, M. N., Hanstein, S., Faust, F., Eitenmüller, P. T., Pitann, B. & Schubert, S.: Diferulic acids in the cell wall may contribute to the suppression of shoot growth in the first phase of salt stress in maize. *Phytochemistry* **102**, 126–136 (2014).
- Updegraff, D. M.: Semimicro determination of cellulose in biological materials. *Anal. Biochem.* **32**, 420–424 (1969).
- Van Volkenburgh, E. & Boyer, J. S.: Inhibitory effects of water deficit on maize leaf elongation. *Plant Physiol.* **77**, 190–194 (1985).
- Willför, S., Pranovich, A., Tamminen, T., Puls, J., Laine, C., Suurnäkki, A., Saake, B., Uotila, K., Simolin, H. & Hemming, J.: Carbohydrate analysis of plant materials with uronic acid-containing polysaccharides. A comparison between different hydrolysis and subsequent chromatographic analytical techniques. *Ind. Crop Prod.* **29**, 571–580 (2009).
- Wood, P. J. & Siddiqui, I. R.: Determination of methanol and its application to measurement of pectin ester content and pectin methyl esterase activity. *Anal. Biochem.* **39**, 418–428 (1971).

- Zhong, H. & Läuchli, A.: Incorporation of [^{14}C]Glucose into Cell Wall Polysaccharides of Cotton Roots: Effects of NaCl and CaCl_2 . *Plant Physiol.* **88**, 511–514 (1988).
- Zörb, C., Mühling, K. H., Kutschera, U. & Geilfus, C.-M.: Salinity Stiffens the Epidermal Cell Walls of Salt-Stressed Maize Leaves: Is the Epidermis Growth-Restricting? *PLoS One* **10**, e0118406 (2015).

5 Zusammenfassung

Salzstress stellt in vielen Regionen der Erde ein wesentliches Problem in der Landwirtschaft dar. Hierbei sind vor allem semiaride Gebiete betroffen, in denen die Verdunstung von Wasser aus dem Boden die Niederschläge übertrifft. Es kommt zu einer Akkumulation von Salz im fruchtbaren Oberboden und führt zu starken Wachstumseinbußen bei Kulturpflanzen (Qadir *et al.* 2006). Salzstress bei Pflanzen kann in 2 Phasen eingeteilt werden: in einer ersten Phase kommt es zu einer Verminderung des Wachstums durch osmotischen Stress, während es in der zweiten Phase des Salzstress bei empfindlichen Genotypen durch Ionentoxizität zum völligen Erliegen des Wachstums kommt. Salzresistente Genotypen können ihr Wachstum auf einem verminderten Niveau aufrecht erhalten (Munns 1993). Durch gezielte Kreuzung von osmotisch resistenten Maislinien mit einer Natrium exkludierenden Inzuchtlinie (NaExII) konnten Hybriden (SR-Hybriden) erstellt werden, die sowohl in der ersten, als auch in der zweiten Phase des Salzstress eine erhöhte Resistenz aufweisen (Schubert 2006). Die Resistenz in der ersten Phase des Salzstress wird von den ähnlich resistenten Maisgenotypen SR 03 und SR 12 mit unterschiedlichen Strategien erreicht. Während SR 03 unter Salzstress die Ansäuerung der Zellwand und somit das Wachstum aufrecht erhält (Pitann *et al.* 2009), erhöht SR 12 die Konzentration von Arabinose in der Hemicellulose (Uddin *et al.* 2013), was zu einer Aufweichung der Zellwand führt. Eine Kombination von aufrecht erhaltener Zellwandansäuerung und erhöhter Arbinosekonzentration sollte zu einer erhöhten Resistenz in der ersten Phase des Salzstress führen. Dies wurde in dieser Arbeit durch die Kreuzung der Mutterlinien von SR 03 und SR 12 und eine anschließende Erstellung von Doppelhaploiden, welche wiederum mit NaExII gekreuzt wurden, überprüft. Die hieraus hervorgegangene Hybride DSR 5 zeigte eine erhöhte Resistenz in der ersten Phase des Salzstress bei gleichzeitiger Aufrechterhaltung der Ansäue-

rung der Zellwand und einer erhöhten Arabinosekonzentration. Dennoch war die Extensibilität der Zellwand in diesem Genotypen unter Salzstress vermindert. Ein weiterer Faktor, der die Zellwandextensibilität beeinflussen könnte, ist die Konzentration der Cellulose in der Zellwand, die unter Salzstress der ersten Phase vermindert ist (Uddin *et al.* 2013). Durch eine erhöhte Calciumgabe bei Pioneer 3906 konnte die Konzentration der Cellulose auf das Niveau der Kontrolle wiederhergestellt werden, jedoch war kein Einfluss auf die Zellwandextensibilität feststellbar. Messungen von weiteren resistenten und empfindlichen Genotypen unter Salzstress ergaben unterschiedliche Reaktionen der Zellwandextensibilität auf Salzstress. Es konnte nicht zwischen resistenten und sensitiven Genotypen unterschieden werden. Eine aufrecht erhaltene Zellwandextensibilität ist somit nicht zwingend für eine Resistenz in der ersten Phase des Salzstress notwendig. Neben der Zellwandextensibilität ist der Turgorschwellenwert ein maßgeblicher Faktor für die Zellstreckung. Dieser wurde durch 100 mM NaCl bei Pioneer 3906 jedoch nicht signifikant verändert und kann somit als begrenzender Faktor unter Salzstress ausgeschlossen werden. Eine weitere Einschränkung des Wachstums liegt in einer verminderten Zellteilung. Die Messung des DNA-Gehaltes im Spross von Pioneer 3906 ergab bei 100 mM NaCl eine um 39,4% verminderte Zellzahl im Vergleich mit Kontrollbedingungen. Dies führt zu der Schlussfolgerung, dass Salzstress durch eine starke Einschränkung der Zellteilung das Wachstum vermindert.

6 Summary

Salt stress is a major problem for agriculture in many parts of the world. Especially semiarid regions are affected, where evaporation exceeds precipitation. This leads to an accumulation of salt in fertile upper soils and results in severe growth depressions of crops (Qadir *et al.* 2006). Salt stress can be separated into two phases: In the first phase of salt stress growth is reduced by osmotic stress. In the second phase ion toxicity leads to a complete collapse of growth in sensitive genotypes while resistant genotypes can maintain growth at a limited level (Munns 1993). By systematic crossing of osmotically resistant maize inbred lines with a newly developed sodium-excluding inbred line (NaExII) salt-resistant hybrids (SR-hybrids) were bred. These hybrids show a higher resistance in the first as well as in the second phase of salt stress (Schubert 2006). Resistance in the first phase of salt stress is achieved by the similarly resistant genotypes SR 03 and SR 12 by different strategies. SR 03 maintains growth under salt stress by maintaining acidification of the cell wall (Pitann *et al.* 2009). SR 12 increases the concentration of arabinose in the hemicellulosic fraction of its cell wall under salt stress (Uddin *et al.* 2013). Both strategies may lead to a higher cell-wall extensibility under salt stress compared to sensitive genotypes. A combination of these strategies should lead to an increase of salt stress in the first phase. This was tested by crossing of the mother lines of SR 03 and SR 12, and establishment of doubled haploids from their offsprings and crossing these with NaExII. From the resulting hybrids (DSR hybrids) DSR 5 showed an increase in arabinose and a maintained cell-wall acidification under salt stress. Nevertheless, cell-wall extensibility was reduced. Another factor that may reduce cell-wall extensibility is the reduced cellulose concentration in the cell wall under salt stress (Uddin *et al.* 2013). Additional calcium in the nutrient solution of Pioneer 3906 led to an increase of cellulose concentration under salt stress compared to the level of

control plants. This restoration of cellulose concentration was not related to an increase of cell-wall extensibility. Measurements of different salt-resistant and sensitive maize genotypes yielded different results in the reaction of cell-wall extensibility under salt stress. There is no direct relationship between salt resistance and cell-wall extensibility. Besides cell-wall extensibility the wall-yield threshold is a relevant factor for cell enlargement. But there was no significant change of wall-yield threshold in Pioneer 3906 under salt stress compared to control conditions. Another growth-restricting factor is the reduction of cell division. Measurement of DNA content of the shoot of Pioneer 3906 under salt stress resulted in a reduction of cells by 39,4% compared to control conditions. This leads to the conclusion that salt stress severely affects cell division and thus growth.

Danksagung

Die Durchführung und die abschließende Anfertigung dieser Arbeit wäre nicht möglich gewesen ohne die Hilfe vieler Menschen. An dieser Stelle möchte ich einer ganzen Reihe Leute Danke sagen. Zuerst einmal meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Sven Schubert, für die Vergabe dieses interessanten Themas, die immer währenden Anregungen zur Durchführung und nicht zuletzt für die finanzielle Unterstützung während der Doktorandenzeit. Herrn Prof. Dr. Steffens, der mich immer wieder mit seiner ganz eigenen Art und einem Augenzwinkern dazu motivieren konnte durchzuhalten und die Arbeit zum Abschluss zu bringen, nicht zuletzt auch durch seine pragmatische Vorgehensweise beim Schreiben wissenschaftlicher Texte. Ein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. Stefan Hanstein, der jederzeit zu fachlichen Diskussionen bereit war und durch sein schier unerschöpfliches Wissen und seine ruhige Art, so einige gedankliche Knoten lösen konnte. Weiterhin möchte Herrn Prof. Dr. Koyro für seine Unterstützung durch Diskussion und Equipment danken, vor allem aber für seine andere Perspektive im Blick auf Zellwände. Der weitaus größte Dank geht an das LTA-Team des Instituts für Pflanzenernährung, sowie dem Team der Gefäßversuchstation, ohne das meine Versuchspflanzen wohl niemals die Geschlechtsreife erlangt hätten. Hierbei ist auf Grund ihrer großen Ruhe und Gelassenheit insbesondere Frau Christina Plachta zu erwähnen, die einen großen Teil zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat. Ein weiterer Dank geht an Herrn David Bouchain für die Hilfe bei der Herleitung der Zellvolumenberechnung. Das Doktorandenteam des Instituts darf selbstverständlich nicht unerwähnt bleiben, da hier immer Raum zur Diskussion bei einer Tasse Kaffee, oder Unterstützung bei Ernten waren. Auch meinen ausländischen Kollegen (Pakistan, Bangladesch, Indien, Türkei, USA, Slowenien, Rumänien und viele andere Länder) möchte ich für die kleinen Einblicke danken, die sie mir in ihre Kultur und Religion erlaubten. Ansonsten möchte ich noch einer Menge weiterer Leute danken, die mir in den letzten dreieinhalb Jahren mit Rat und Tat zur Seite gestanden und mich aufgebaut haben wenn es mal nicht so lief wie es sollte. Denn in der Forschung gilt:

Zwei Dinge sind zu unserer Arbeit nötig: Unermüdliche Ausdauer und die Bereitschaft, etwas, in das man viel Zeit und Arbeit gesteckt hat, wieder wegzuerwerfen.

-Albert Einstein

Erklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

(Quelle: Promotionsordnung des Fachbereichs Agrarwissenschaften, Ökotropologie und Umweltmanagement der Justus-Liebig-Universität Gießen, vom 7. Juli 2004)

(Philipp T. Eitenmüller)

