

GEFÖRDERT VOM



Bundesministerium
für Bildung
und Forschung

Veröffentlichung der Ergebnisse von Forschungsvorhaben im BMBF-Programm

Biologische Innovation und Ökonomie

Forschungsvorhaben: Verbundprojekt: BioEnergie 2012, Modul B1:
OPTIMAS: Systembiologische Modellierung der Ertragsbildung bei Mais
(Koordination)

Förderkennzeichen: 0315430A

Zuwendungsempfänger: Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-
Nürnberg, Postfach 35 20, 91023 Erlangen

Ausführende Stelle: Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg -
Naturwissenschaftliche Fakultät - Department Biologie - Biochemie, Staudtstr. 5,
91058 Erlangen

Projektleitung: Prof. Dr. Uwe Sonnewald

Laufzeit: 01.02.2009 bis 31.07.2012

„Das diesem Bericht zugrundeliegende BMBF-Forschungsvorhaben wurde mit
Mitteln des Bundesministeriums für Bildung und Forschung unter dem
Förderkennzeichen 0315430A gefördert. Die Verantwortung für den Inhalt
dieser Veröffentlichung liegt beim Autor.“

Inhaltsverzeichnis

I. Kurze Darstellung des Projektes

- I.1. Aufgabenstellung
- I.2. Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde
- I.3. Planung und Ablauf des Vorhabens
- I.4. Wissenschaftlicher und technischer Stand
- I.5. Zusammenarbeit mit anderen Stellen

II. Eingehende Darstellung

- II.1. Ergebnisse
- II.2. Wichtigste Positionen des zahlenmäßigen Nachweises
- II.3. Notwendigkeit, Angemessenheit der geleisteten Arbeit
- II.4. Voraussichtlicher Nutzen
- II.5. Bekanntgewordener Fortschritt
- II.6. Veröffentlichungen

I. Kurze Darstellung des Projektes

I.1. Aufgabenstellung

Ziel von OPTIMAS war die Identifizierung von Stoffwechselprozessen und von Leitgenen, die positiv mit einer hohen Biomassenproduktion bei der C₄-Pflanze Mais korrelieren, und deren experimentelle Überprüfung in einer genetisch und phänotypisch diversen Mais-Population. Hierzu wurden mathematische Modelle genutzt und weiterentwickelt, die diese Korrelationen zwischen Ertragsdaten und Änderungen im Stoffwechsel vorhersagen und damit letztlich die Leitgene identifizieren, die für diese Änderungen bestimmend sind. Damit stellt OPTIMAS eine systembiologische Herangehensweise an die Frage dar, wie die pflanzliche Biomasse zur Nutzung als Energiemasse gesteigert werden kann, und erlaubt gleichzeitig neue, für biotechnologische Lösungen nutzbare Einblicke in die Verteilung der pflanzlichen Ressourcen zur Bildung vegetativer Biomasse.

I.2. Voraussetzungen unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde

Alle Projektpartner verfügen über einschlägige Erfahrungen auf dem entsprechenden Forschungsgebiet und sind größtenteils über frühere Kooperationen bereits gut miteinander vernetzt. Die Projektpartner in Erlangen verfügen über die für die Projektdurchführung relevante Infrastruktur wie etwa Plattformen zur Metabolom- und Transkriptomanalytik und Möglichkeiten zur kontrollierten Pflanzenanzucht in Phytokammern.

I.3. Planung und Ablauf des Vorhabens

Das Projekt ist in mehrere Arbeitspakete unterteilt. Modul I, Biochemische und molekulare Determinanten der Biomasseproduktion, unterteilt sich in I.1 Metabolisches Profiling, I.2 Flussanalysen (I.2.1 Metabolische Fluss Analyse, I.2.2 Membrantransport von Metaboliten) und I.3. Transkriptomanalyse. Modul II mit dem Titel „Physiologische Determinanten der Biomassenproduktion“ gliedert sich in II.1 Entwicklungsphysiologie und II.2 Einfluss der Mykorrhiza auf die Biomassenproduktion. Modul III schließlich beinhaltet die Mathematische Modellierung der Biomassenproduktion und gliedert sich in III.1 Generierung von Datenbanken zur Ablage und Erfassung der erhobenen Parameter aus Modul I und II, III.2 Generierung metabolischer und regulatorischer Netzwerke und III.3 Korrelative Auswertung der Daten. In Modul IV werden alle mathematischen Vorhersagen validiert.

I.4. Wissenschaftlicher und technischer Stand zu Beginn des Vorhabens

Die Produktion von Biomasse ist stark von Umweltbedingungen, aber auch genotypischen Faktoren abhängig. Bisherige Untersuchungen zur Biomassebildung im Mais konzentrierten sich meist nur auf einen oder sehr wenige dieser Einflüsse. Im OPTIMAS-Projekt sollten nun verschiedene, die Biomasse beeinflussende Faktoren, unter vergleichbaren Bedingungen erforscht werden. Für die kontrolliert angebaute Pflanzen werden phenotypische Parameter, wie die Biomasse oder Wachstumsrate, erhoben und mit Daten aus

Transkriptions- und Metaboliteanalysen verglichen. Am Ende können die Datensätze zur Identifizierung von spezifischen und generellen Wachstumsmarkern eingesetzt werden.

Weiterhin sollte ein Versuchsansatz geschaffen werden, der es ermöglicht, mit Hilfe von Markierungsexperimenten die Stickstoffaufnahme bzw. Stickstoffverteilung in den Pflanzen besser zu verstehen. Da Biomasse und Ertrag auf Anpassungen im pflanzlichen Stoffwechsel beruhen, werden grundlegende physiologische Parameter zusätzlich mit Fluxom-Analysen kombiniert. Die Ergebnisse sollten Erkenntnisse über die Stickstoffverteilung in den Pflanzen mit unterschiedlichen Stresssymptomen liefern.

I.5. Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Das Projekt wurde gemeinsam mit Kollegen des Max-Planck-Instituts für Molekulare Pflanzenphysiologie in Golm (Dr. Alisdair Fernie, Dr. Sandra Witt), der Universität zu Köln (Prof. Marcel Bucher, Dr. Nina Zellerhoff), der Universität Düsseldorf (Prof. Andreas Weber, Dr. Andrea Bräutigam, Thea Pick), der Universität Regensburg (Prof. Thomas Dresselhaus, Dr. Manfred Gahrtz, Philipp Alter, Mariana Mondragon-Palomino), des Leibniz-Instituts für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung Gatersleben (Dr. Uwe Scholz, Prof. Dr. Falk Schreiber, Christian Colmsee, Tobias Czauderna, Anja Hartmann, Martin Mascher) und der Metanomics GmbH (Dr. Stefan Henkes, Dr. Holger Fahnenstich) konzipiert und durchgeführt.

II. Eingehende Darstellung

II.1. Ergebnisse

Modul I . Pflanzenanzucht

Zu Beginn des Projektes wurden standardisierte Anzuchtbedingungen für den Maisanbau in Klimakammern etabliert. Unsere Arbeiten konzentrierten sich dabei auf Maiswachstum in der vegetativen Phase und den Einfluß von Kältestress, Stickstoff- und Phosphatmangel auf die Biomasseproduktion. Ausführliche Studien zur Stressanpassung fanden zunächst in den Sourceblättern von zwei Referenzgenotypen, A188 und B73, statt, und umfaßten phenotypische Charakterisierungen, Transkriptom-, Metabolom- und Ionenprofilanalysen. Vergleichende Stickstoffmangelexperimente wurden dann mit vierzehn weiteren Maislinien durchgeführt, die zuvor bei Feldversuchen als gute oder schlechte Stickstoffverwerter eingestuft worden waren.

Modul I. 1. Anpassung der Profiling-Techniken

In Zusammenarbeit mit dem Projektpartner am IPK Gatersleben (AG Scholz) wurde ein 44K Maisarray basierend auf der Agilenttechnologie entwickelt und getestet. Die Annotation der verwendeten Sequenzen konnte in enger Abstimmung zwischen den Arbeitsgruppen Weber, Scholz und Sonnewald an die aktuelle Version des Maisgenoms angepaßt und den anderen Projektpartner zur Verfügung gestellt werden. Alle Transkriptommessungen wurden in der AG Sonnewald durchgeführt. Die Ernte des Pflanzenmaterials für die molekularen Untersuchungen und die RNA-Isolierungen fand in allen Arbeitsgruppen nach einem einheitlichen Protokoll statt.

Standardisierte Methoden zur Untersuchung der Stickstoffaufnahme und -verteilung durch ¹⁵N-Markierung und der anschließenden Analyse der differentiellen Anreicherung von markierten Aminosäuren wurden anhand von Experimenten mit den Vergleichsgenotypen A188 und B73 etabliert.

Modul I. 2. Fluss-Analysen

Mögliche Mechanismen für die genotypisch spezifischen Unterschiede in der Biomassebildung sollten über die Messung von Stickstoffflüssen untersucht werden. Die zu untersuchenden Maislinien unterscheiden sich bezüglich ihrer Ertragseigenschaften und wurden bei optimaler Stickstoffversorgung, sowie unter Mangelbedingungen angebaut. Zunächst wurden die Maisgenotypen A188 und B73 als Referenzen für erste Experimente verwendet. Das Vorhandensein von genotypisch-spezifischen Unterschieden in der Stickstoffassimilation und -verteilung unter verschiedenen Stickstoffbedingungen sollte überprüft werden. Zudem sollte geprüft werden, ob diese Ergebnisse verwendet werden können, um metabolische Flüsse in den Pflanzen nachzuvollziehen. Letzten Endes wurde getestet, ob Korrelationen zwischen Stickstoffverteilung und Biomasseproduktion existieren. Während des Wachstums stellt die Messung der Blattlängen eine nicht-invasive Methode dar, die Wachstumsgeschwindigkeit zu ermitteln. Wie in Abbildung 1 zu sehen unterscheiden sich die Pflanzen bereits aufgrund der physiologischen Parameter Blattlänge, Blatt- und

Sprossbiomasse. Da der Samen die junge Pflanze mit den wichtigsten Nährstoffen versorgt, kommt der Effekt der unterschiedlichen N-Düngung erst ab Blatt 5 zum tragen. Genotypische Unterschiede sind 20 Tage nach der Keimung messbar, wie auch behandlungsbedingte Unterschiede. B73-Pflanzen wachsen offensichtlich schneller, da sie (i) in der gleichen Zeit signifikant längere Blätter aufweisen als A188 (ii) und auch signifikant vermehrt Biomasse und Blattbiomasse produzieren. Zudem zeigt die N-Mangelbehandlung phänotypische Auswirkungen: Pflanzen beider Genotypen wachsen unter N-Stress signifikant langsamer und produzieren signifikant weniger Biomasse im Spross sowie in den Blättern im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen.

Die unterschiedliche Stickstoffverwertbarkeit der Pflanzen wurde durch Analyse des N-Einbaus in Aminosäuren, mittels Markierung mit ^{15}N -Isotopen, untersucht. Die Auswertung erfolgte als prozentualer Anteil des ^{15}N auf die gesamte N-Menge einer Aminosäure.

Die Einbaukinetik von ^{15}N in beispielsweise die Aminosäure Aspartat (Abb. 1) verlief nach *source/sink* spezifischen Unterschieden: In jüngeren Blättern (Blatt 7) ist der Einbau deutlich verringert, im Vergleich zu älteren (Blatt 5 und 6). Die N-Fixierung scheint in Blatt 5 zu passieren und ^{15}N wird vermehrt in Blatt 7 transportiert. Es ist demnach ein Fluss aus dem Pool festzustellen.

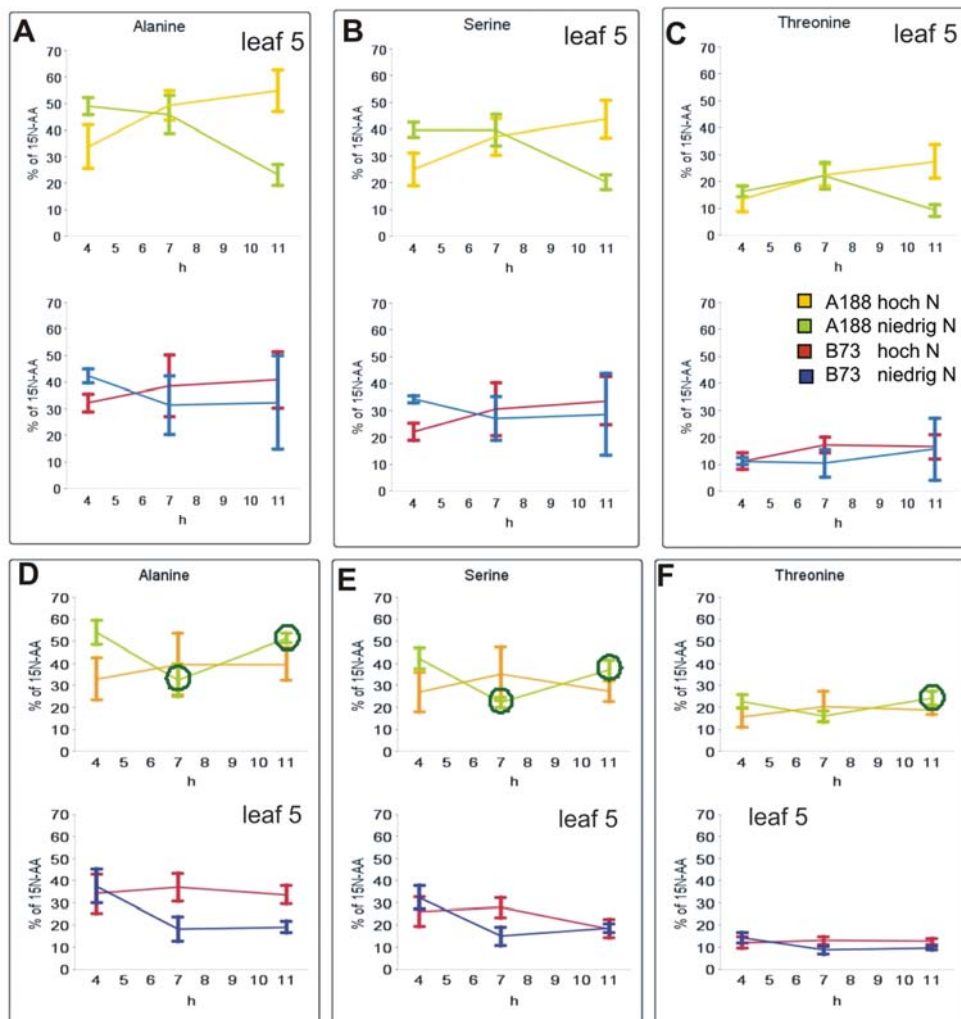


Abb. 1 Die Einbaukinetik von ^{15}N in zwei unabhängigen Experimenten in die Aminosäuren Alanin, Serin und Threonin im Vergleich.

A188-hoch-N-Pflanzen zeigen eine steile N-Einbaurate bis 7 Stunden, anschließend erreicht die ¹⁵N-Aufnahme bereits ein Plateau oder sinkt wieder etwas ab. Die Aufnahme in B73-Pflanzen verläuft weniger steil zwischen 4 und 7 Stunden oder gleich stark wie bei A188, erreicht nach 11 Stunden das Niveau der A188 Pflanzen, oder es wird etwas unterschritten.

Bei den niedrig-N-Pflanzen des B73 Genotyps ist die Kinetik ähnlich wie unter hoch-N-Bedingungen. A188-Pflanzen reagieren demnach flexibler auf das N-Angebot als B73-Pflanzen, da sich ihre Stickstoffeinbaurate entsprechend anpasst. Der Genotyp B73 scheint kein solches N-Management zu besitzen, das innerhalb von 11 Stunden adaptieren kann.

Darüber hinaus zeigte sich überraschenderweise eine hohe Flussrate von N in die Aminosäure Serin. Diese Aminosäure ist typisch für den photorespiratorischen Stoffwechsel, welcher in der C₄-Pflanze Mais kaum stattfinden sollte. Die Gründe für die starke *de novo* Synthese von Serin sind im Moment unklar.

Die Untersuchungsmethoden der unterschiedlich N-behandelten Referenzgenotypen A188 und B73, die unter N-Mangel und Kontrollbedingungen kultiviert wurden, wurden anschließend auf die Genotypen Tzi25 und EP1 angewendet, um so deren unterschiedliche Strategien, Stickstoff zu verwerten, herauszufinden.

Beide Genotypen wurden unter drei verschiedenen Bedingungen in Mangelerde kultiviert, dabei bedeutet 10% N (= niedrig N) eine Versorgung mit 1,5 mM KNO₃, 50% N (= medium N) mit 7,5 mM KNO₃ und hoch N 100% N mit 15 mM KNO₃. Am Tag 30 nach der Keimung wurden die Pflanzen mit ¹⁵NO₃K markiert und 2, 5, bzw. 8 Stunden später geerntet. Analysiert wurden Blatt 4, ein seneszendes Blatt, Blatt 5, ein *source*-Blatt, und Blatt 6. Letzteres bildet das erste *source*-Blatt in niedrig-N-Pflanzen, die eine verzögerte Wachstumsgeschwindigkeit besitzen.

Analog zu den N-Mangelexperimenten der Referenzgenotypen konnten mit der unterschiedlichen N-Behandlung phänotypische Effekte ausgelöst werden. Aufgrund der Nährstoffversorgung über den Samen, konnten signifikante Unterschiede erst ab Blatt 5 erzielt werden. Zudem machen sich genotypische Unterschiede hier schneller bemerkbar. Tzi25 Pflanzen wachsen schneller und zeigen auch früher behandlungsbedingt Unterschiede im Vergleich zu EP1.

Mit der LC-MS/MS wurden die Gehalte der Aminosäuren bestimmt. Die phänotypischen Unterschiede spiegelten sich im unterschiedlichen Gehalt einzelner Aminosäuren wider. Deutliche Unterschiede zwischen der hoch-N-(100%) und der niedrig-N-(10%)-Behandlung waren in folgenden Aminosäuren messbar: Serin, Alanin, Threonin, Asparagin, Glutamat und Citrullin. Der Einbau von ¹⁵N in Aminosäuren zeigte keine genotypisch veränderten Kinetiken, wenn die Düngung mit 10% und 100%N verglichen wurde. Dennoch sind Unterschiede behandlungsbedingt zu sehen. Hoch-N-Pflanzen bauen schneller und in vermehrtem Umfang ¹⁵N in folgende AA ein: Glutamat, Serin, Alanin, Valin, Phenylalanin, Tyrosin, Threonin, Methionin, Prolin.

Andererseits ist die ¹⁵N-Einbaurate in Blatt 6 bei einer N-Versorgung mit 50% leicht unterschiedlich. Tzi25 ist in der Lage, schneller ¹⁵N zu verwerten als EP1 und verfügt somit über eine bessere Strategie Stickstoff zu verwerten.

Modul 1.3. Transkriptomanalyse

Insgesamt waren im Projekt ca. 450 Microarray-Hybridisierungen eingeplant. Am Ende wurden 488 Messungen zu den verschiedenen Experimenten von den Projektpartnern durchgeführt (Tabelle 1). Besonders umfangreich waren die Transkriptomanalysen zum Stickstoffmangel, da dieses Teilprojekt im besonderen Interesse des Industriepartners lag.

Tabelle 1: Übersicht über die im OPTIMAS-Projekt durchgeführten Microarray—Hybridisierungen. In den Spalten wird auch die Anzahl der in den Experimenten gemessenen unterschiedlichen Genotypen, Gewebe, Anzuchtbedingungen und Erntezeitpunkte angegeben.

Experiment	OPTIMAS-Partner	Genotypen	Gewebe	Anzucht- bedingungen	Erntezeit- punkte	Gesamt- probenzahl
Kältestress	AG Sonnewald (Erlangen)	2	2	2	3	96
N-Mangel	AG Sonnewald (Erlangen)	4	9	3	2	220
P-Mangel	AG Sonnewald (Erlangen)	1	1	3	1	12
Blühinduktion	AG Dresselhaus (Regensburg)	4	1	1	3	36
Trockenstress	AG Dresselhaus (Regensburg)	4	2	2	1	48
Blattgradient	AG Weber (Düsseldorf)	1	10	1	1	40
Mycorrhiza	AG Bucher (Köln)	1	2	2	1	36
SUMME						488

Die AG Sonnewald konzentrierte sich bei der Auswertung der Transkriptomanalysen auf die Daten aus den Kältestress-, N-Mangel- und P-Mangel-Experimenten. Der Einfluss von Stickstoffmangel auf das Pflanzenwachstum von Mais und die damit verbundenen molekularen Vorgänge wurden in einem Paper unter dem Titel: „Maize source leaf adaptation to nitrogen deficiency affects not only nitrogen and carbon metabolism but also control of phosphate homeostasis“ in *Plant Physiology* veröffentlicht. Umfassende neue Erkenntnisse konnten vor allem über die Anpassung des Primärsstoffwechsels in Sourceblättern erworben werden, dieser zeichnet sich vor allem durch eine generelle Verminderung der Aktivität unter Stickstoffmangel aus. Besonders interessant war die Erkenntnis, dass die Kontrolle des Phosphathaushaltes auch unter Stickstoffmangel eine entscheidende Rolle spielt. Die parallel durchgeführten Metabolitanalysen vom selben Pflanzenmaterial konnten zeigen, dass gleichzeitig lösliches Phosphat und die phosphorylierten Intermediate angesammelt wurden. Ein erheblicher Teil der stressbedingt hochregulierten Transkripte konnte mit der Regulation der Phosphathomeostase in Verbindung gebracht werden.

Aufgabe des Projektes war die Erforschung von Genen, Metaboliten und Prozessen, die die Biomasseproduktion beeinflussen. Unter Stress reduziert die Pflanze das Wachstum, um Ressourcen für die Stressanpassung zur Verfügung stellen zu können. Da die Grundsteine für die Pflanzenbiomasse in den Sourceblättern gebildet werden, wurde die Reaktion des primären Kohlenstoff-, Stickstoff- und Phosphorhaushalt auf Stress in diesem Gewebe genauer untersucht (Abbildung 2).

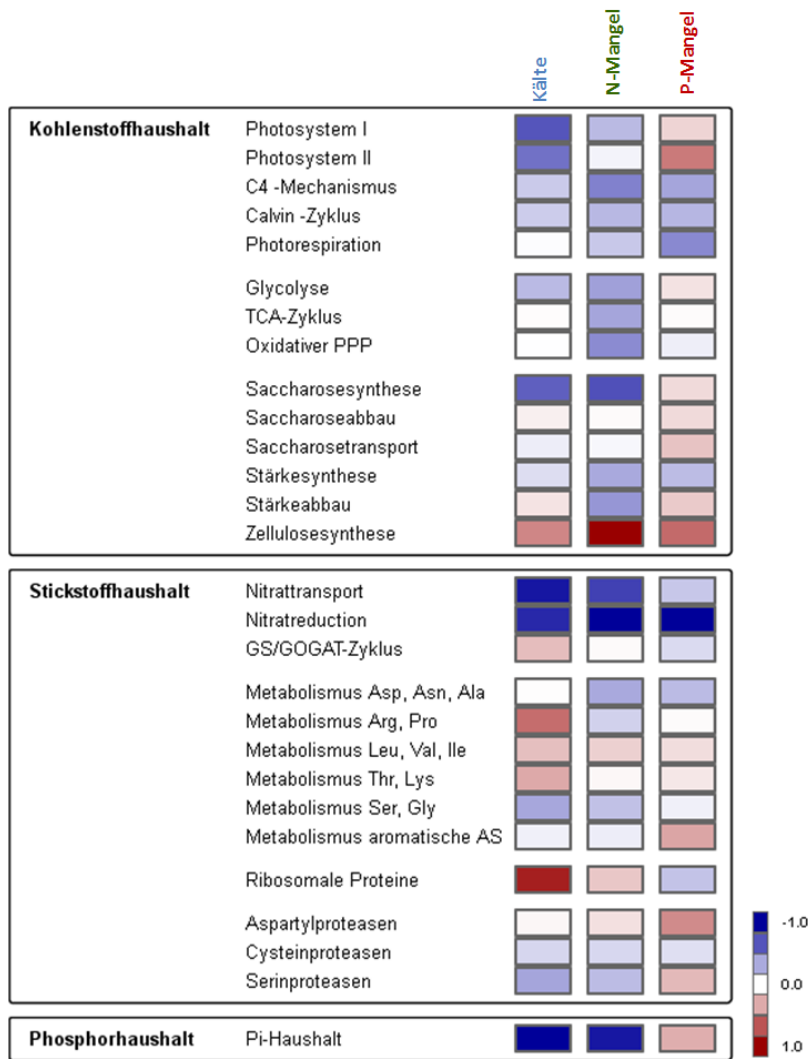


Abb 2: Zusammengefaßte Änderungen der Expression von Transkripten, die in verschiedene Prozesse des Primärstoffwechsels involviert sind. Die Heatmaps zeigen durchschnittliche Log₂-Werte der Verhältnisse von Transkription unter Stress gegen Transkription in der Kontrollanzucht.

Einheitliche Reaktion auf alle drei Stresssituationen waren eine Herunterregulation des Nitratstoffwechsels und eine erhöhte Expression von Zellulosesynthasen unter Streß. Ersteres ist vermutlich eine Sekundärreaktion auf den geringen Bedarf an Aminosäuren für das Wachstum unter Stress. Es wird vermutet, dass unter N-Mangel die Limitierung von Nitrat als Substrat für die Regulation des Nitratstoffwechsels verantwortlich war, unter Bedingungen mit ausreichender Nitratversorgung waren dagegen Feedback-Mechanismen durch die Reaktionsprodukte (Aminosäuren) aktiv.

Im Gegensatz dazu waren Transkripte des Phosphathaushaltes nicht einheitlich unter den untersuchten Bedingungen reguliert. Transkripte, die hauptsächlich mit P-Mangel in Verbindung gebracht werden, waren unter Bedingungen mit ausreichender Phosphatversorgung reduziert. Eine solche streng mit den Phosphatgehalten korrelierende Transkription vieler Gene auch unter N-Mangel oder Kältestreß konnte in unseren Experimenten erstmals nachgewiesen werden. Es zeigt, dass die Kontrolle der Phosphathomeostase generell wichtig ist für die metabolische Stressanpassung.

Der Kohlenhydratstoffwechsel von Kälte und N-Mangel gestressten Pflanzen wies viele Ähnlichkeiten auf, P-Mangel hatte dagegen eine generelle Abnahme von Kohlenstoffmetaboliten zur Folge. In der Transkription spiegelte sich das in einer Stimulierung der Photosynthesegene und einer Präferenz des Kohlenstoffeinbaus in Saccharose statt Stärke wieder.

Die Ergebnisse dieser vergleichenden Studie wurden in einem Manuskript unter dem Titel: „Adaptation of maize source leaf metabolism to stress related disturbances in carbon, nitrogen and phosphorus balance“ zusammengefaßt. Im Moment liegt das Paper bei Metanomics zur Prüfung.

Detaillierte Untersuchungen zur Verteilung des Stickstoffs in der Maispflanze ergaben erhebliche Unterschiede in den verschiedenen Geweben, aber auch entlang des Blattgradienten. Für die Studien an zwei ausgewählten Maislinien mit unterschiedlicher Nitratverwertung unter Stickstoffmangel wurden deshalb Proben von der Basis, Mitte und Spitze des Blattes getrennt geerntet.

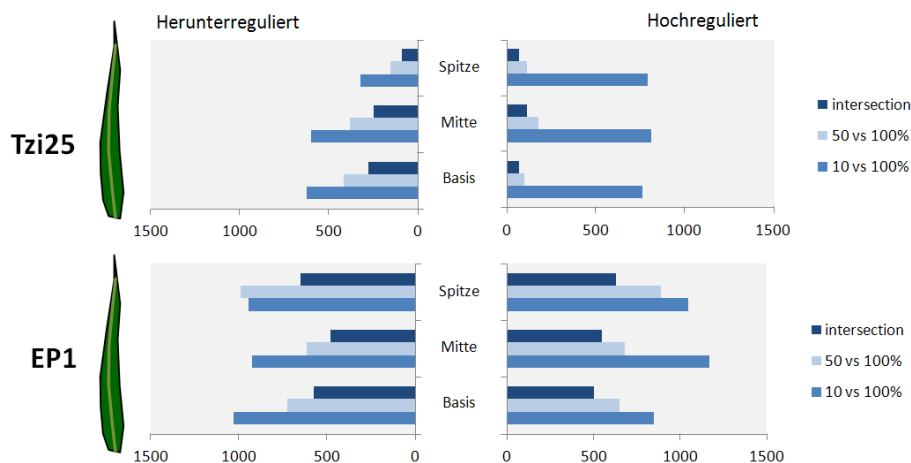


Abb 3. Anzahl von Transkripten, die durch Stickstoffmangel signifikant (Änderungen Streß gegen Kontrolle >2fach; FDR < 0,05) in verschiedenen Anschnitten von Maisblättern reguliert wurden. Die Balken zeigen die Werte von Pflanze unter mildem (50%) und starkem (10%) Stickstoffstreß.

Die effiziente Linie Tzi25 wies dabei weniger signifikant regulierte Transkripte auf als der weniger effiziente Genotyp EP1, besonders unter Bedingungen mit mildem N-Mangel, wenn die Nitratversorgung der Pflanzen nur auf 50% herabgesetzt war (Abbildung 3). Während die Expressionsmuster in Tzi25 dominiert wurden von herunterregulierten Genen, zeigten die Ergebnisse für EP1 auch eine erhebliche Anzahl von hochregulierten Gene. Der größere Aufwand an transkriptioneller Regulation kann zu der verringerten Effizienz dieser Linie unter Stickstoffmangel beigetragen haben.

Modul II.1. Ertragsphysiologische Analysen der Maispflanzen

Vom industriellen Projektpartner (BASF/Metanomics) wurden für die Versuche insgesamt 25 Maislinien mit unterschiedlicher Effizienz unter Stickstoffmangel oder Trockenstreß zu Verfügung gestellt. Da sich die Untersuchungen der Arbeitsgruppen in Erlangen besonders auf den Einfluß von Stickstoffmangel auf das Pflanzenwachstum konzentrierten, wurden alle

Linien mit vorhergesagter unterschiedlicher Stickstoffeffizienz unter den standardisierten Bedingungen angebaut. Gemessen wurde dabei die Blattwachstumsrate über einen Zeitraum von 10 Tagen vor der Ernte, dann 30 Tage nach Beginn der Keimung die effiziente PSII Quantumeffizienz der Blätter, die Anzahl der Blätter, das Sproßfrischgewicht und das Verhältnis zwischen Frisch- und Trockengewicht.

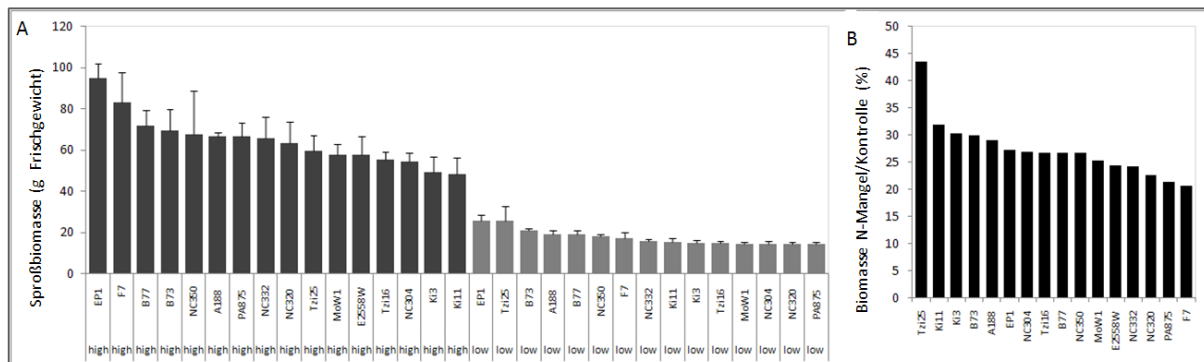


Abb 4: Sproßfrischgewicht verschiedener Maislinien. Abbildung 4A zeigt die Biomasse der einzelnen Linien unter N-Mangel (low) und Kontrollbedingungen (high), in 4B wird die Biomasse unter N-Mangel in Vergleich zur jeweiligen Kontrolle in Prozent dargestellt.

Abbildung 4 faßt die Ergebnisse der Biomasseproduktion in den Maislinien unter N-Mangel (lowN: 0.15mM Nitrat) und Kontrollbedingungen (highN: 15mM Nitrat) zusammen. Genotyp EP1 bildete unter Kontrollbedingungen die höchste Biomasse aus, N-Mangel führte allerdings zu erheblichen Einbußen in der Biomassebildung. Die Linie Tzi25 lag mit der Biomasseproduktion unter Kontrollbedingungen im Mittelfeld, wurde aber im Vergleich mit allen anderen Linien am wenigsten vom Streß durch Stickstoffmangel beeinflusst. Von allen im Experiment angebauten Pflanzen wurde das sechste Blatt geerntet und bei Metanomics auf Metabolitprofile untersucht. Mit Hilfe einer Pearson-Korrelationsanalyse wurde ermittelt, ob es generelle Korrelationen zwischen Biomassebildung und Metabolitgehalten gibt. Lediglich für Tryptophan ergab sich ein positiver Korrelationskoeffizient von über 0,7 (0,72). Da diese aromatische Aminosäure ein Substrat für das Wachstumshormon Auxin darstellt, ist es durchaus möglich, dass Tryptophangehalte in Pflanzen unter verschiedenen Stickstoffbedingungen wichtige Marker für die Biomassebildung darstellen. Allerdings sind weitere Versuche für die Bestätigung dieser Theorie notwendig.

Ertragsphysiologische Parameter wurden in den Jahren 2010 und 2011 auch zu den Feldversuchen der BASF in Iowa (USA) durchgeführt. Im ersten Jahr wurde der Einfluß der Pflanzendichte auf das Wachstum der einzelnen Maislinien untersucht. Die Biomasse der Pflanzen war dabei besonders vom Reifetyp der Linien abhängig. Wie zu erwarten, bildeten frühreifende Linien geringere Sproßmassen aus als die spätreifenden tropischen Linien. Statistische Analysen der phenotypischen Parameter ergaben eine gute Korrelation der Blattbreite mit der Sproßbiomasse in den untersuchten Linien. Da sich diese im Gegensatz zu Sproßmasse auch im Feld gut messen läßt, konnte die Blattbreite als wichtiger Marker für die Biomasse der Pflanzen ermittelt werden. In Jahre 2011 wurden ausgewählte Maislinien in Plots mit unterschiedlicher Stickstoffversorgung angebaut. Allerdings waren zum

Erntezeitpunkt noch keine signifikanten stichstoffabhängigen Unterschiede im Wachstum zu messen.

Modul III.3. Korrelative Auswertung der Daten

Das OPTIMAS-Projekt zielte auf die Identifizierung von Marker- oder Leitgenen, die mit der Biomassebildung der Pflanzen in Verbindung stehen. Zur Auswertung der im Projekt erhobenen umfassenden Transkriptomdaten wurde in der AG Scholz die Anwendung der WGCNA (weighted correlation network analysis: Langfelder und Hovarth, BMC Bioinformatics, 2008) etabliert. Diese erlaubt die Korrelation von Transkriptomdatensätzen mit phenotypischen Merkmalen. Die in Erlangen durchgeführten Versuche ergaben Datensätze zum Einfluß von Kältestress (Genotypen A188, B73; Zeitpunkte 20, 30 und 40 Tage nach Keimung; Anzucht unter Kältestress, Kontrollbedingungen als auch nach Ende der Streßbehandlung), von Stickstoffmangel (Genotypen A188 und B73; Zeitpunkte 20 und 30 Tagen nach Keimung, Anzucht unter Stickstoffmangel- und Kontrollbedingungen) und von Phosphatmangel (Genotyp B73, Zeitpunkt 30 Tage nach Keimung; Anzucht unter drei verschiedenen Phosphatebedingungen). Da Pflanzen unterschiedlichen Alters beprobt wurden, werden die Transkriptdaten zur Wachstumsrate der Blätter, als altersunabhängigem Parameter für das Wachstum, verglichen. Insgesamt 8 Transkripte mit negativer und 16 mit positiver Korrelation zu Wachstumsrate zeigten in allen drei Experimenten Korrelationskoeffizienten kleiner als -0,7 oder größer als 0,7. Diese werden in Tabelle 2 aufgelistet.

Tabelle 2: Transkripte, deren Expressionsmuster stark mit der Wachstumsrate der Pflanzen korrelieren. Es werden die WGCNA-Korrelationswerte aus den einzelnen Stressexperimenten angegeben

OPTIMAS_ID	N-			Maisgenom-Locus	Beschreibung
	Kälte	Mangel	Mangel		
OptiV1C08150	-0.815	-0.736	-0.890	GRMZM2G092895	alpha/beta hydrolase
OptiV1C04786	-0.704	-0.729	-0.874	GRMZM2G025646	early flowering protein
OptiV1N34864	-0.795	-0.704	-0.871	GRMZM2G068277	unknown protein
OptiV1S18446	-0.912	-0.799	-0.834	GRMZM2G103939	fucosyltransferase
OptiV1N37049	-0.892	-0.775	-0.832		no correspondence on 4a.53
OptiV1S31480	-0.828	-0.910	-0.822	GRMZM2G468756	serine/threonine protein kinase
OptiV1S24680	-0.785	-0.717	-0.812	GRMZM2G121543	DNA repair protein RAD51/RHP5
OptiV1C07309	-0.736	-0.839	-0.810	GRMZM2G069923	RING/U-box superfamily protein
OptiV1C06223	0.874	0.825	0.910	GRMZM2G066636	haloacid dehalogenase-like hydrolase
OptiV1C08466	0.786	0.816	0.907	GRMZM2G142386	nitrate reductase
OptiV1S19330	0.763	0.803	0.905	GRMZM2G076723	nitrate reductase
OptiV1C12873	0.730	0.788	0.899	GRMZM2G138349	Ca ²⁺ -dependent phospholipid-binding protein
OptiV1C17709	0.824	0.787	0.895	GRMZM2G140924	RING/U-box superfamily protein
OptiV1C05416	0.788	0.719	0.886	GRMZM2G141241	unknown
OptiV1S26164	0.811	0.727	0.876	GRMZM2G108537	nodulin MtN21 /EamA-like transporter
OptiV1C15800	0.837	0.731	0.872	GRMZM2G003409	hydroxyproline-rich glycoprotein
OptiV1C01857	0.737	0.709	0.859	GRMZM2G157247	unknown protein
OptiV1C03650	0.844	0.796	0.849	GRMZM2G079559	octicosapeptide/Phox/Bem1p protein
OptiV1S28559	0.848	0.705	0.837	GRMZM2G076417	Subtilisin-related protease
OptiV1C00335	0.849	0.865	0.811	AC205362.4_FG002	amino acid transporter
OptiV1C02712	0.729	0.857	0.795	GRMZM2G166906	glucose-methanol-choline oxidoreductase
OptiV1C15697	0.747	0.938	0.787	GRMZM2G099052	unknown protein
OptiV1S19578	0.788	0.759	0.759	GRMZM2G122787	acyl-CoA synthetase
OptiV1C10211	0.708	0.745	0.725	GRMZM2G069198	Mn ²⁺ and Fe ²⁺ transporters of the NRAMP family

Wie schon oben beschrieben, wurde der Nitrathaushalt unter Stress generell herunterreguliert. In die WGCNA-Analysen gingen nun umfangreichere Datensätze (mehr Genotypen, mehr Zeitpunkte) als in die obenerwähnte Analyse ein, aber zwei Transkripte für Nitratreduktase wiesen trotzdem starke positive Korrelation zum Wachstum auf. Für die

meisten anderen Transkripte in der Liste sind noch keine genaueren Funktionsbeschreibungen vorhanden. Weitere Versuche sind notwendig, um herauszufinden, ob die Kandidatentranskripte als Leitgene in die Regulation des Wachstums involviert sind, oder doch eher sekundäre Anpassungen an das Wachstum darstellen. Auch in letzterem Falle können sie als wertvolle Wachstumsmarker dienen.

II.2. Wichtigste Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

Der abschließende Verwendungsnachweis wird zurzeit erstellt und nach Prüfung durch die Hauptkasse der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg dem PtJ vorgelegt.

II.3. Notwendigkeit, Angemessenheit der geleisteten Arbeit

Die Mittel sind entsprechend der unter II.1. dargelegten Arbeiten unter Einhaltung der guten wissenschaftlichen Praxis und eines möglichst sorgsamem Umgangs mit öffentlichen Geldern verwendet worden. Alle Arbeiten waren notwendig und angemessen und über den Projektverlauf wurden jährliche Zwischenberichte beim Projektträger eingereicht.

II.4. Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse im Sinne des Verwertungsplans

Die im Rahmen des Projektes erzielten Ergebnisse stellen einen deutlichen Fortschritt zum Verständnis der Regulation des Stoffwechsels im Mais dar unter verschiedenen Umweltbedingungen dar. Die systembiologische Auswertung der Daten konnte zum besseren Verständnis des Einflusses wichtiger Stoffwechselprozesse auf das Wachstum beitragen. Statistische Analysen konnten Transkripte und Metabolite mit hoher Korrelation zur Biomasse identifizieren. Ein Teil der Ergebnisse ist bereits publiziert und damit für die Wissenschafts-Community zugänglich. Das Projekt war generell Grundlagen-orientiert, so dass eine direkte Anwendung der Ergebnisse für die Pflanzenzüchtung erst langfristig zu erwarten ist.

II.5. Fortschritte auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen

Während der gesamten Projektlaufzeit wurde kontinuierlich die Literatur auf projektrelevante Veröffentlichungen gesichtet. Die Veröffentlichung des Maisgenoms im November 2009 (Schnable et al., 2009; Science 326) hat generell die Durchführung von Transkriptionsstudien in dieser Kulturpflanze befördert. Zum Ende des Projektes lagen zum Beispiel Veröffentlichungen zur Anpassung von Mais an Stickstoffmangel vor (Yang et al., 2011, Plant Physiology 157: 1841; Amiour et al., 2012, Journal of Experimental Botany 63: 5017) und konnten mit den eigenen Daten verglichen werden. Systembiologische Arbeiten mit vergleichbar umfangreicher Datenerhebung wurden bisher aber noch nicht veröffentlicht.

II.6. Veröffentlichungen der Ergebnisse

Bisher gingen, nach Prüfung und Freigabe durch die Pflanzeninnovationsagentur, aus den beschriebenen Arbeiten drei Publikationen in internationalen, begutachteten Zeitschriften hervor:

Pick TR, Bräutigam A, Schlüter U, Denton AK, Colmsee C, Scholz U, Fahnenstich H, Pieruschka R, Rascher U, Sonnewald U, Weber APM. 2011. Systems analysis of a maize leaf developmental gradient redefines the current C4 model and provides candidates for regulation. *Plant Cell* 23: 4208-4220.

Schlüter U, Mascher M, Colmsee C, Scholz U, Bräutigam A, Fahnenstich H, Sonnewald U. 2012. Maize source leaf adaptation to nitrogen deficiency affects not only nitrogen and carbon metabolism but also control of phosphate homeostasis. *Plant Physiology* 160: 1384-1406.

Colmsee C, Mascher M, Czauderna T, Hartmann A, Schlüter U, Zellerhoff N, Schmitz J, Bräutigam A, Pick TR, Alter P, Gahrtz M, Witt S, Fernie AR, Börnke F, Fahnenstich H, Bucher M, Dresselhaus T, Weber APM, Schreiber F, Scholz U, Sonnewald U. 2013. OPTIMAS-DW: A comprehensive transcriptomics, metabolomics, ionomics, proteomics and phenomics data information resource for maize. *BMC Plant Science* (doi:10.1186/1471-2229-12-245)

Schlüter U, Colmsee C, Scholz U, Bräutigam A, Weber APM, Zellerhoff N, Bucher M, Fahnenstich H, Sonnewald U. Adaptation of maize source leaf metabolism to stress related disturbances in carbon, nitrogen and phosphorus balance. *BMC Genomics*, *in press*.