



## Doctoral Thesis

# **Genetic variation in nitrogen-response of maize root systems Establishment of image-based approaches under controlled conditions and in the field**

**Author(s):**

Le Marié, Chantal

**Publication Date:**

2016

**Permanent Link:**

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-010613247> →

**Rights / License:**

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

DISS. ETH NO. 23146

Genetic variation in nitrogen-response of maize root systems:  
establishment of image-based approaches under controlled  
conditions and in the field

A thesis submitted to attain the degree of

DOCTOR OF SCIENCES of ETH ZURICH

(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by

Chantal Andrée Le Marié

Dipl. - Biol., RWTH Aachen

Born on 18.12.1985

citizen of Germany

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Achim Walter

PD Dr. Andreas Hund

Prof. Dr. Emmanuel Frossard

2016

## Summary

Since the beginning of the 20th century, agricultural yields strongly increased. The reason for this was, amongst others, that the production of nitrogen fertilizer became rather cheap after the invention of the Haber-Bosch process in the 1920ies, leading to increased nitrogen application rates, especially in industrialized countries.

The seemingly unlimited availability of cheap fertilizer also influenced crop breeding strategies to aim at a high responsiveness to nitrogen rather than high nitrogen use efficiency. One crop which especially profited from this development was maize, whose yield increased five-fold in only 60 years from the middle of the 20th century to the beginning of the 21st century (Smith et al. 2004). Although nitrogen fertilization obviously had a positive effect on the yield, there was a growing concern about its ecological footprint which was negatively affected by the leaching of nitrate or the emission of nitrogenous gases, such as the greenhouse gas nitrous oxide. After an intensification of these problems during the 1970ies, the necessity for alternatives increased (Cole et al. 1997).

One approach to reduce fertilizer application rates is breeding for nutrient efficient crops. Nutrient efficient crops should ideally optimize homeostasis and survive periods characterized by limited resources while simultaneously taking up more nutrients from the soil. Nutrient uptake is closely connected to the root system as roots are the organ responsible for water and nutrient uptake and maize is an optimal model plant to study this interrelation due to its strong responsiveness to nitrogen fertilization. Past research could demonstrate that modifications of the root system can lead to a higher uptake of nitrogen and different phenotypes were proposed to deal with low nitrogen availability.

Breeding for root traits is a promising tool to increase the nitrogen uptake of the crop, but to date adequate tools are lacking. During the last decade, various phenotyping approaches were developed to study root growth, but most of them were restricted to greenhouse conditions and seedlings stages. However, for an adequate supply of nutrients and water, root types are responsible that are formed at later developmental stages and cannot be accessed until the three-four leaf stage for maize. Therefore, a new high-throughput screening method was developed and tested for its suitability to screen maize root growth for nitrogen responses. The aim was to develop a method that allows high throughput screening of the responsiveness to nitrogen availability and in the following the identification of gene regions that are involved in the expression of certain traits.

Maize plants were cultivated in “rhizoslides”, an advancement of the former “pouches”, consisting of an artificial growing unit using germination paper as substrate. The germination paper covered a vertical transparent Plexiglas plate and was covered by a transparent foil itself. Roots grew between the germination paper and the transparent foil.

The major advantages of the rhizoslides were an increased surface area enabling a cultivation phase until the four leaf stage and the possibility to apply a split-nutrient treatment without spatial separation of the root system. The rhizoslides themselves were integrated into the RADIX facility (Rhizoslide platform allowing high throughput digital image analysis of root system expansion), a phenotyping platform developed to facilitate an optimal growing environment for the rhizoslides. The rhizoslides were irrigated with an automatic irrigation system and shoot and root growth was monitored with a custom-built imaging unit. Continuous observation of root growth revealed that plants respond to changes in nitrogen availability within days rather than within minutes. A screening of 24 genotypes demonstrated that most genotypes responded equally to high nitrogen availability by almost doubling their crown and lateral root growth in the high N compartment with strong variation in the intensity of the genotype specific responses. For example, elongation of crown roots differed almost two times between the fastest and slowest growing genotype. A stronger selective root placement in the high-N compartment was related to an increased shoot development indicating that early vigor might be related to a more intense foraging behavior. The major advantages of the RADIX compared to existing root phenotyping platforms are (i) the high number of replications (100 rhizoslides) that enable genetic studies, (ii) the split-nutrient application that allows the study of the response of roots to nitrogen availability within the same plant and (iii) the simultaneous study of shoot and root development.

Although the achieved throughput allows to face breeding problems, the setup remains artificial and differs from field conditions. To get a deeper understanding of the connection between root system architecture and plant performance, the conduction of field experiments is indispensable. Therefore, a field based method was developed and tested with a set of 36 genotypes across three different environments and years. The method was based on the so called “shovelomics” approach, a method that relies on excavating and rating of maize root stocks, combined with image analysis. The advancement was that root stocks were not rated anymore, but imaged in a custom-built imaging tent and analyzed with the “Root estimator of shovelomics traits” (REST) software. This adaptation increased screening speed by 6.5 times. Genotypes were characterized by a steeper rooting angle and a less dense root system (expressed by the fill factor) under nitrogen deficiency. A strong differential response in rooting angle was positively correlated with silage and kernel yield whereas a weak responsiveness increased lodging resistance. The results obtained under nitrogen limitation promote the proposed “steep, cheap and deep ideotype” (Lynch et al. 2013).

This ideotype is characterized by unresponsiveness to higher nitrogen reserves in the top soil to survive periods with limited nitrogen by using deeper resource layers in the soil. In contrast, the results revealed that a shallow rooting angle and a dense root system seemed to be advantageous under sufficient nitrogen availability. The shallower rooting angle and the denser root system is equivalent to a bigger root system and could also be a result of a vigorous plant, but a counter-argument to this hypothesis is the fact that only the responsiveness of the rooting angle to nitrogen availability was correlated with shoot parameter and not the rooting angle under high or low nitrogen availability itself. Besides root traits, the traits yield and stay green were significantly affected by the nitrogen treatment. Therefore, this approach could be a valid and fast alternative to screen for nutrient efficient crops.

The observations made in the RADIX facility as well as the observations from the field indicate that a dynamic response is advantageous under heterogeneous nitrogen distribution. A steep rooting behavior with few lateral roots in the top soil seems to be advisable under limiting conditions whereas a local increase in root growth proved to be useful for an optimal uptake of local resources. Differential response of crown roots to split-nutrient applications may be a tool to quantify foraging behavior in genome mapping or for selection experiments. A pre-screening in the RADIX with a validation in a field experiment in the following could be a possible approach to select genotypes for breeding relevant root traits.

## Zusammenfassung

Seit dem Beginn des 20ten Jahrhunderts, kam es zu einer starken Steigerung der landwirtschaftlichen Erträge. Dies ging unter anderem auf eine Zunahme des Einsatzes von mineralischen Stickstoffdüngern zurück, die nach der Erfindung des Haber-Bosch-Verfahrens günstig produziert werden konnten. Die Folge der günstigen Produktion war eine Zunahme der Düngerapplikation vor allem in Industrieländern. Dadurch verlagerte sich der Schwerpunkt der Pflanzenzüchtung hin zur Selektion solcher Pflanzen, die eine Anpassung an die hohen Stickstoffgaben zeigten, anstatt deren Stickstoffnutzungseffizienz zu optimieren. Eine Kulturpflanze, die stark von diesen Entwicklungen profitierte, war der Mais, dessen Ertrag sich innerhalb von 60 Jahren, von der Mitte des 20ten bis zum Anfang des 21ten Jahrhunderts um das Fünffache steigerte (Smith, 2004). Trotz der positiven Ertragsentwicklung gab es jedoch zunehmend Bedenken bezüglich der (negativen) ökologischen Auswirkungen hoher Düngergaben, die sich in Problemen wie der Nitratauswaschung oder der Emission von treibhauseffektverstärkenden Stickstoffoxiden, manifestierten. Nach einer Verschärfung dieser Probleme in den 70er Jahren begann man mit der Suche nach Alternativen (Cole, 1997).

Eine Möglichkeit, um die Düngemengen von Stickstoff zu reduzieren, ist die Züchtung von stickstoffeffizienten Pflanzen. Pflanzen mit hoher Stickstoffeffizienz können optimal mit ihren internen Stickstoffreserven haushalten und gleichzeitig mehr Stickstoff vom Boden aufnehmen. Diese Nährstoffaufnahme ist eng verknüpft mit dem Wurzelsystem, da Wurzeln das Organ darstellen, das für die Aufnahme von Wasser und Nährstoffen verantwortlich ist. Mais ist eine optimale Modellpflanze um diesen Zusammenhang zu untersuchen, da die Entwicklung von Mais stark mit der Stickstoffdüngung verknüpft ist. Bereits in der Vergangenheit konnte gezeigt werden, dass Veränderungen am Wurzelsystem zu einer höheren Aufnahme von Stickstoff führen können und unterschiedliche Phänotypen wurden propagiert, die optimal an die Stickstoffverfügbarkeit angepasst sein sollten. Die Züchtung auf Wurzelmerkmale stellt ein vielversprechendes Mittel dar, um die Aufnahme von Stickstoff durch die Pflanze zu erhöhen, allerdings mangelt es bisher an geeigneten Züchtungsansätzen.

In den letzten Jahren wurden viele Phänotypisierungsmethoden entwickelt um Wurzelwachstum zu studieren, oft jedoch begrenzt auf die Nutzung im Gewächshaus und auf die Untersuchung von Keimlingen. Allerdings sind für eine adäquate Versorgung mit Nährstoffen und Wasser Wurzeltypen verantwortlich, die sich erst später in der Pflanzenentwicklung ausbilden.

Um den Zusammenhang zwischen Wurzelwachstum und Stickstoffaufnahme an Mais zu untersuchen, wurde daher im Rahmen dieser Arbeit eine neue Hochdurchsatzphänotypisierungsmethode entwickelt und auf ihre Anwendbarkeit hin getestet. Ein wichtiges Kriterium bei der Entwicklung war, dass die Methode einen Durchsatz erzielen sollte, der es ermöglicht Genregionen zu identifizieren, die an der Ausprägung bestimmter Merkmale als Reaktion auf die Stickstoffverfügbarkeit beteiligt sind.

Dafür wurden Maispflanzen in sogenannten „Rhizoslides“ angezogen, eine Weiterentwicklung der früheren „Pouches“. Rhizoslides bestehen aus einer Plexiglasplatte, bedeckt mit Keimpapier, das als Substrat dient, welches wiederum selbst von einer transparenten PE Folie abgedeckt wird. Zwischen Papier und Folie kann sich das Wurzelsystem frei entfalten. Der Hauptvorteil der Rhizoslides gegenüber den alten Pouches ist eine größere Oberfläche, verbunden mit einer längeren Kultivierungsphase bis zum vier Blattstadium und die Möglichkeit unterschiedliche Stickstoffdüngungen zu applizieren, ohne eine räumliche Trennung des Wurzelsystems vorauszusetzen. Um eine optimale Wachstumsumgebung für die Pflanzen in den Rhizoslides zu gewährleisten, wurde die Phänotypisierungsplattform RADIX (Rhizoslides platform allowing high throughput digital image analysis of root system expansion) entwickelt. Innerhalb der RADIX wurden die Rhizoslides mit einem automatischen Bewässerungssystem bewässert. Spross und Wurzelwachstum wurden dabei mit einer selbstentwickelten Aufnahmeeinheit dokumentiert.

In einer ersten Pilotstudie konnte aufgrund kontinuierlicher Beobachtung des Wurzelwachstums gezeigt werden, dass die Pflanzen auf eine Änderung in der Stickstoffzufuhr in einem Zeitraum von Tagen und nicht innerhalb von Stunden reagieren. In einer darauf folgenden Untersuchung von 24 Genotypen zeigte sich, dass die meisten Genotypen auf die erhöhte Stickstoffgabe mit einer Verdopplung des Kron- und Lateralwurzelswachstums reagierten, wobei sich die Genotypen in der Stärke ihrer Reaktion unterschieden. So variierte beispielsweise das Kronwurzelswachstum zwischen dem Schnellsten und Langsamsten Genotypen beinahe um den Faktor zwei. Ein stärker ausgeprägtes selektives Kronwurzelswachstum im Kompartiment mit viel Stickstoff korrelierte mit verstärktem Sprosswachstum. Dies lässt vermuten, dass eine gute Jungpflanzenentwicklung mit einer ausgeprägten Verstärkung des Wachstums hin zu und in der Nähe von Nährstoffen verbunden ist. Die Hauptvorteile der RADIX-Plattform im Vergleich zu bestehenden System sind i) die hohe Anzahl an Wiederholungen (100 Rhizoslides), die ausreicht um genetische Studien durchzuführen ii) die Möglichkeit der Applikation von unterschiedlichen Nährstoffen, die es ermöglicht die Antwort von unterschiedlichen Wurzeln der gleichen Pflanze auf die Stickstoff Verfügbarkeit zu studieren iii) die gleichzeitige Beobachtung von Spross- und Wurzelwachstum.

Obwohl der erreichbare Durchsatz die Beantwortung züchtungsrelevanter Fragen ermöglichen würde, bleibt das System artifizuell und unterscheidet sich stark von Feldbedingungen. Daher ist die Durchführung von Feldversuchen zum tiefgreifenden Verständnis der Verbindung zwischen Wurzelarchitektur und Leistung der Pflanze unumgänglich.

Als Ergänzung zur RADIX wurde daher eine feldbasierte Methode entwickelt und an einem Set von 36 Genotypen an drei verschiedenen Standorten und über zwei Jahre hinweg getestet. Die Methode basierte auf der sogenannten „Shovelomics“ Methode, die darauf gründet Wurzelstöcke auszugraben und zu bonitieren. Die Weiterentwicklung bestand darin, dass die Wurzelstöcke nicht mehr bonitiert wurden, sondern stattdessen nach dem Ausgraben in einem selbst entworfenen Aufnahmezelt fotografiert und im Folgenden mit der Software REST analysiert wurden. Dieses Vorgehen erhöhte die Durchsatzrate um das Sechseinhalbfache. Genotypen zeichneten sich unter wenig Stickstoff durch einen tieferen Wurzelwinkel und ein weniger stark verzweigtes Wurzelsystem aus. Ein stark differentielles Verhalten war positiv korreliert mit dem Silo- und Kornertrag wohingegen ein wenig ausgeprägtes differentielles Verhalten mit einer größeren Standfestigkeit korrelierte. Die Erkenntnisse, die unter geringer Stickstoffdüngung gewonnen wurden, unterstützen den in den letzten Jahren stark propagierten Phänotyp, der als steil und tief wurzelnd bei möglichst geringer Investition in Wurzelmasse im Oberboden, beschrieben wird. Dieser optimale Phänotyp zeichnet sich dadurch aus, dass er auf die verfügbare Stickstoffkonzentration im Oberboden nicht reagiert, sondern stattdessen die Wurzeln in tiefere Regionen vorantreibt, um Phasen mit limitierten Ressourcen mit Hilfe der in tieferen Lagen stärker verfügbaren Ressourcen zu überstehen. Im Gegensatz dazu zeigte sich in diese Studie, dass ein flaches dichtes Wurzelsystem unter viel Stickstoff von Vorteil ist. Ein breiteres und dichteres Wurzelsystem entspricht allerdings auch einem größeren Wurzelsystem und könnte auch einfach eine Folge der generell besseren Pflanzenentwicklung unter viel Stickstoff sein. Gegen diese Hypothese spricht allerdings, dass nur die dynamische Anpassung des Wurzelwinkels, der gleichzeitig ein Maß für die Größe des Wurzelsystem ist, mit Sprossmerkmalen korrelierte und nicht der Wurzelwinkel unter viel und wenig Stickstoff. Neben den Wurzelmerkmalen waren auch die Sprossmerkmale Ertrag und Blattgrüne stark von dem verfügbaren Stickstoff beeinflusst und könnten eine attraktive und schnelle Alternative zur Untersuchung von Stickstoffnutzungeffizienz darstellen.



Die Beobachtungen, die sowohl in der RADIX als auch im Feld gemacht wurden, lassen vermuten, dass eine dynamische Anpassung in einer heterogenen Umgebung von Vorteil ist. Ein tiefes Wurzelsystem mit einer geringen Bildung von Lateralwurzeln im Oberboden scheint unter limitierenden Stickstoff Bedingungen von Vorteil zu sein, wohingegen ein intensiviertes lokales Wachstum sich für eine optimale Aufnahme von lokalen Ressourcen als nützlich erwies. Die differentielle Untersuchung von Wurzelwachstum in Systemen mit geteilter Nährstoffverfügbarkeit könnte eine Möglichkeit darstellen Generegionen zu identifizieren, die bei der Ausprägung von Merkmalen, welche mit der gerichteten Suche nach Nährstoffen verknüpft sind, eine Rolle spielen. Außerdem kann mit der RADIX mit überschaubarem Aufwand eine Vorselektion von Genotypen getroffen werden, die dann im Weiteren im Feld eingehender untersucht werden kann.