

Diss. ETH No. 18807

Response of maize (*Zea mays* L.) seedlings to low and high
temperature:
association mapping of root growth and photosynthesis-related traits

A dissertation submitted to the
ETH Zurich

for the degree of
Doctor of Sciences

presented by

Regina Reimer

M.Sc., Justus-Liebig-University Giessen, Germany

born July 3rd, 1977

citizen of Germany

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Peter Stamp, examiner

Dr. Andreas Hund, co-examiner

Prof. Dr. Albrecht E. Melchinger, co-examiner

2010

Summary

Abiotic stress, like unfavorable temperature, is responsible for reduced yields throughout the world. Therefore, breeders aim to develop plants that are adapted to changing and challenging environments. In maize, breeders selected and developed heterotic groups of germplasm to take advantage of non-additive genetic variation. In cool regions of central and northern Europe these heterotic groups comprise the flints with European flint and Flint/Lancaster background and the dents with Iodent and Iowa/Stiff Stalk background. In this project a set of inbred lines from these backgrounds was used. It was derived from a breeding program of the University of Hohenheim, Stuttgart, Germany. Seedling growth was tested through a range of favorable and unfavorable temperatures in growth pouches, consisting of an A4-size germination blotter covered by a plastic sheet. As roots stopped growing at the extremes of 12°C and 40°C, limits were set accordingly and plants were tested at chilling stress of 16°C, close-to-optimal conditions of 28°C and heat stress of 36°C.

The first part of this study aimed to assess root elongation and photosynthesis-related traits with regard to temperature performance. Temperature stress affected all measured physiological and morphological traits. Elongation of both axile and lateral roots, shoot growth and photosynthesis were strongly affected by chilling. Heat stress effects occurred but were less severe than chilling stress effects. Flints and dents were clearly separated according to principle coordinate analysis, which justified a separate analysis for both groups. The flints had greener, smaller leaves and an increased photosynthesis under chilling stress. They grew thicker roots and less seminal roots than the dents. The dents developed axile roots elongating faster at optimum temperature than the flints and accumulated more leaf dry weight at optimum temperature and under heat stress. The association mapping yielded 1 to 50 associations, dependent on the trait, and explained proportions of the genetic variance ranging from 27.3 to 92.6%. The individual effect per association averaged at 30%. The flints were genetically less diverse at temperature-tolerance loci than the dents, but carried the chilling tolerance alleles for Φ_{PSII} more frequently. The dents carried the trait increasing alleles for axile root length and heat tolerance alleles for k_{Lat}/ER_{Ax} . A higher number of associations for the root elongation traits like ER_{Ax} , was detected compared to the static traits, like the total root length at the end of experiment. This increased power of using elongation rates to detect association-by-temperature interaction effects justifies the greater time expense for the

repeated measurements. The altered root morphology was mostly caused by the response of ER_{Ax} to temperature, as an increase of k_{Lat}/ER_{Ax} was frequently collocated with a decrease of ER_{Ax} . Candidate genes have been selected according to their assumed function in temperature stress tolerance. A major proportion of those genes are related to the sugar metabolism. Therefore, the cytosolic glycolysis pathway was identified as a candidate pathway based on its metabolic adaptability, which facilitates plant acclimation to challenging environments.

The second part of the study aimed to examine temperature-dependent heterosis for physiological and morphological traits by using a diallel cross of two flint and two dent inbred lines. It was hypothesized that i) temperature dependent combining ability could be used to establish a wider temperature range in the hybrids and ii) that mid-parent heterosis (MPH) and better-parent heterosis (BPH) could serve as predictors for hybrid performance from inbred performance. The first hypothesis was met for treatment-by-SCA (specific combining ability) interactions meaning that one inbred line was conferring chilling or heat tolerance in a specific combination with another inbred line. The second hypothesis was not met since MPH and BPH regressions on genotypic mean values were not significant for most traits. In general, hybrids performed better than the inbreds. Inbred lines differed in their physiological and morphological performance and all performed best at optimum conditions. Heterosis was more expressed at the temperature extremes for the photosynthetic traits and was greatest at optimum conditions for shoot growth traits.

The third part of this study aimed to improve the separation of axile from lateral roots after the digital image analysis. The image analysis software supplies a distribution of root lengths in diameter classes, which is typically bimodal in case of maize seedling roots. The peak at the smaller diameter classes represents the lateral roots; the one for the larger diameter classes represents the axile roots. Finding the appropriate threshold to separate the two peaks is a critical step in the analysis of root morphology. So far this step was not automated and the threshold had to be selected manually. To improve the procedure, different non-parametric and parametric functions were evaluated to automate the separation of the putative peaks of axile and lateral roots. A Gaussian mixture model of two normal distributions was most suitable to determine this threshold.

In conclusion, the phenotyping platform successfully allowed for a precise application of the desired temperature stress and a high throughput screening of the study material as it is required for an association mapping approach. The association-by-temperature interaction

model was successful in detecting significant associations especially for the root elongation rates. The flint heterotic group was genetically less diverse than the dent group and their allelic contribution to tolerance differed with regard to chilling and heat stress. The map projection with a publicly available genetic map revealed candidate genes involved in the sugar metabolic pathway to play a key role in root elongation under unfavorable temperature conditions.

Zusammenfassung

Ernteerträge von Mais werden weltweit durch abiotischen Stress, wie z. B. ungünstige Wachstumstemperaturen, stark reduziert. Das Ziel des Züchters ist es daher, Pflanzen zu entwickeln, die an wechselnde und ungünstige Umweltbedingungen angepasst sind. Im Falle von Mais haben Züchter heterotische Gruppen selektiert und entwickelt, um die nicht-additive genetische Variation zu nutzen. In den kühlen Lagen Zentral- und Nordeuropas bestehen diese Gruppen aus dem Hartmais, mit europäischer und „Flint/Lancaster“ Herkunft, und aus dem Zahnmais, mit „Jodent“ und „Iowa/Stiff Stalk“ Herkunft. Das ausgewählte Material enthält europäische Inzuchtlinien aus beiden heterotischen Gruppen. Das Material stammt aus einem Zuchtprogramm der Universität Hohenheim in Stuttgart (Deutschland). Die Jugendentwicklung unter optimalen und ungünstigen Temperaturbereichen wurde in sogenannten Wachstumshüllen getestet. Diese bestehen aus einem A4 Keimpapier, welches mit einer schwarzen PET-Folie bedeckt ist. Da das Wurzelwachstum bei 12°C und 40°C stagnierte, wurden Testtemperaturen von 16°C als unterer Schwellenwert (Kühlestress), 36°C als oberer Schwellenwert (Hitzestress) und 28°C als Kontrolle (Optimum) ausgewählt.

Der erste Teil der Dissertation hatte zum Ziel, Wurzelwachstum und Photosyntheseparameter im Hinblick auf ihr Temperaturverhalten zu bewerten. Der Temperaturstress beeinträchtigte alle physiologischen und morphologischen Parameter. Das Haupt- und Seitenwurzelwachstum, die Sprossentwicklung und die Photosynthese waren stark durch die kühlen Temperaturen beeinträchtigt. Der Hitzestress hatte ebenfalls negative Auswirkungen, wobei diese weniger gravierend waren als die des Kühlestresses. Hartmais und Zahnmais Linien waren laut der Faktorenanalyse genetisch voneinander verschieden was eine separate Auswertung der beiden Gruppen erlaubte. Der Hartmais entwickelte grünere, kleinere Blätter und hatte eine höhere Photosyntheseleistung in der Kühle, im Vergleich zum Zahnmais. Des Weiteren entwickelte er weniger, aber dafür dickere Hauptwurzeln. Der Zahnmais entwickelte Hauptwurzeln mit einer erhöhten Wachstumsrate unter optimalen Temperaturen im Vergleich zum Hartmais. Ebenso bildete er mehr Blatttrockenmasse bei optimalen Temperaturen sowie in der Hitze. Die Assoziationskartierung ergab 1 bis 50 signifikante Assoziationen, abhängig von den untersuchten Parametern, welche 27,3 bis 92,6% der genotypischen Varianz erklären. Der Einfluss der einzelnen Assoziation lag im Durchschnitt bei 30%. Der Hartmais war an den Genorten für Temperaturtoleranz weniger divers, trug jedoch das Kühletoleranzallel für

die Quanteneffizienz des Photosystems II eines lichtadaptierten Blattes (Φ_{PSII}) häufiger als der Zahnmais. Der Zahnmais wiederum trug die merkmalerhöhenden Allele für die Hauptwurzellänge und auch die Hitzetoleranzallele für das Verhältnis von Seitenwurzel- zu Hauptwurzelwachstumsrate ($k_{\text{Lat}}/\text{ER}_{\text{Ax}}$). Es wurden mehr QTLs für die dynamischen Wurzelwachstumsmerkmale gefunden als für statische Merkmale, die nur am Ende des Experiments gemessen wurden. Dies deutet auf eine höhere Präzision der dynamischen Merkmale hin, was die zeitaufwendigeren wiederholten Messungen rechtfertigt. Die veränderte Wurzelmorphologie basierte meistens auf einer Reaktion seitens der Hauptwurzelwachstumsrate (ER_{Ax}). Das schliesst sich daraus, dass eine Erhöhung des Merkmals $k_{\text{Lat}}/\text{ER}_{\text{Ax}}$ häufig mit einer Verminderung von ER_{Ax} einherging. Aufgrund ihrer mutmasslichen Funktion bei der Toleranz gegenüber Temperaturstress wurden Kandidatengene ausgewählt. Ein grosser Teil dieser Gene ist in den Zucker-Metabolismus, insbesondere die zytosolische Glykolyse, involviert. Eine gute Anpassungsfähigkeit der zytosolischen Glykolyse an schwankende Temperaturen ist für das Gleichgewicht des pflanzlichen Stoffwechsels wichtig.

Der zweite Teil dieser Arbeit zielte darauf ab, temperaturabhängige Heterosis für physiologische und morphologische Merkmale anhand einer Teilmenge von Hart- und Zahnmais Inzuchtlinien zu eruieren. Folgende Hypothesen wurden aufgestellt: i), dass temperaturabhängige Kombinationseignung zur Schaffung eines breiteren Temperaturoptimums in den Hybriden genutzt werden kann und ii), dass die Heterosis im Vergleich zum Elternmittel (MPH) und im Vergleich zum besseren Elter (BPH) die Hybridleistung aufgrund der Elternleistung vorhersagen kann. Die erste Hypothese konnte für die Umwelt \times SCA Interaktion (SCA, spezifische Kombinationseignung) bestätigt werden, was bedeutet, dass eine bestimmte Inzuchtlinie in Kombination mit einer anderen bestimmten Inzuchtlinie die Kühle- oder Hitzetoleranz des Hybriden erhöhte. Die zweite Hypothese wurde nicht bestätigt, da die MPH und BPH Regression zum Mittelwert der Genotypen für die meisten Merkmale nicht signifikant war. Das bedeutet, dass die Hybridleistung in den meisten Fällen nicht durch die Eigenleistung der Eltern vorhersagbar war. Im allgemeinen zeigten die Hybriden eine bessere Leistung als die Inzuchtlinien. Letztere zeigten physiologische und morphologische Unterschiede und alle entwickelten sich unter optimalen Bedingungen am besten. Heterosis für die Photosynthese äusserte sich am stärksten in den

Extremtemperaturen, während Heterosis Effekte für das Sprosswachstum unter optimalen Bedingungen am grössten waren.

Der dritte Teil dieser Arbeit zielt darauf ab, die Trennung von Haupt- und Seitenwurzeln im Anschluss an die Bildanalyse zu verbessern. Das Bildanalyseprogramm liefert eine Verteilung der Wurzellängen in Durchmesserklassen, die im Falle von Mais typischerweise einen zweigipfligen Verlauf zeigt. Der Scheitelpunkt der niedrigen Durchmesserklassen repräsentiert die Seitenwurzeln und der Scheitelpunkt der hohen Klassen die Hauptwurzeln. Den adäquaten Schwellenwert zwischen beiden Scheitelpunkten zu finden, ist ein kritischer Schritt in der Analyse der Wurzelmorphologie. Bislang war dieser Schritt nicht automatisiert und der Schwellenwert wurde manuell ausgewählt. Um dies zu automatisieren, wurden verschiedene nicht-parametrische und parametrische Modelle geprüft. Ein gemischtes Model von zwei Gauss'schen Normalverteilungen erwies sich dafür als am besten geeignet.

Schlussfolgernd kann gesagt werden, dass die Phänotypisierungs-Plattform, bestehend aus den Wachstumshüllen, eine präzise Einstellung des gewünschten Temperaturstresses erlaubte und eine Hochdurchsatz-Analyse des Materials ermöglichte. Das Model war geeignet zur Detektion von signifikanten Assoziation \times Umwelt-Interaktionen insbesondere für solche im Zusammenhang mit dem Wurzelwachstum. Der Hartmais war genetisch weniger divers als der Zahnmais und der Beitrag ihrer jeweiligen Allele zur Toleranz unterschied sich für Kühle- und Hitzestress. Die Projizierung der Assoziationen auf eine öffentlich verfügbare genetische Karte führte zur Identifikation von Kandidatengenen des Zucker-Metabolismus, welche eine entscheidende Rolle für das Wurzelwachstum unter ungünstigen Temperaturbedingungen spielen.