



Diplomarbeit

am Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung der Universität für Bodenkultur, Wien

zum Thema

Phänotypisierung der Nodulierung an Blattmerkmalen der Sojabohne

eingereicht von

Wolfgang Deix

Betreuer: Ao. Univ. Prof. DI Dr. Johann Vollmann

Institutsvorstand: O. Univ. Prof. Dr. Hans-Peter Kaul

Wien, April 2008

Vorwort

An dieser Stelle ist es mir ein Anliegen mich bei denjenigen Menschen zu bedanken, die mir während meiner Studienzeit hilfreich zur Seite gestanden sind.

Mein herzlicher Dank gilt vor allem meinen Eltern, welche mir das interessante und vielseitige Studium der Landwirtschaft ermöglicht haben. Durch die finanzielle Unterstützung von eurer Seite war es mir möglich sorgenfrei zu studieren und diesen interessanten Zeitabschnitt in meinem Leben unbeschwert zu genießen.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei meinen Studienkollegen und Freunden, deren Hilfsbereitschaft und Geduld ich immer bewundert habe. Besonders lobend möchte ich an dieser Stelle meine Freundin Elisabeth erwähnen. Du hast fast immer ein offenes Ohr für mich und meine Probleme gehabt und bist mir auch während der Erstellung dieser Arbeit gerne mit Rat und Tat zur Seite gestanden.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Ao.Univ.Prof. Dr. Johann Vollmann, dem ich die ausgezeichnete Betreuung dieser Arbeit zu verdanken habe. Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei ihm für seine zahlreichen interessanten und lehrreichen Lehrveranstaltungen, welche ich während meiner Studienzeit besuchen durfte.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	3
2. Literaturübersicht	5
2.1. Biologische Stickstoff-Fixierung	5
2.2. Entwicklung der Symbiose	7
2.3. Knöllchentypen	9
2.4. Sojabohne	10
2.4.1. Systematik und Herkunft	10
2.4.2. Morphologie	10
2.5. Nichtnodulierende Sojabohnen	11
2.6. Image-Analyse	12
2.6.1. Anwendungsmöglichkeiten	12
3. Problemstellung	14
4. Material und Methoden	15
4.1. Versuchsmaterial	15
4.1.1. Beschreibung der Kreuzungseltern	15
4.2. Versuchsstandort und Versuchsanlage	18
4.2.1. Temperatur	19
4.2.2. Boden	21
4.3. Analysierte Merkmale	22
4.4. Hydro N-Tester	23
4.5. Sigma Scan Pro Vers. 5.0.	24
4.6. Minolta Chromameter 200b	24
4.7. Experiment 1	25
4.8. Experiment 2	26
4.9. Experiment 3	27
4.10. Datenauswertung	28
5. Ergebnisse	29

5.1. Ergebnisse Experiment 1	29
5.1.1. Chi-Quadrat-Test	29
5.1.2. Varianzanalyse	30
5.1.3. Chlorophyllgehaltsvergleich	31
5.1.4. Korrelationsanalyse	33
5.1.5. Graphische Darstellung der Korrelationen	34
5.2. Ergebnisse Experiment 2	35
5.2.1. Varianzanalyse	35
5.2.2. Mittelwertsvergleich	38
5.3. Ergebnisse Experiment 3	40
5.3.1. Korrelationsanalyse	40
5.3.2. Graphische Darstellung der Korrelationen	41
6. Diskussion	44
6.1. Experiment 1	44
6.1.1. Aufspaltung	44
6.1.2. Chlorophyllgehalt	44
6.1.3. Blattfarbe	45
6.2. Experiment 2	45
6.2.1. Chlorophyllgehalt	45
6.2.2. Blattfarbe	46
6.2.3. Blattgröße	47
6.3. Experiment 3	47
7. Zusammenfassung	48
8. Abstract	50
9. Literaturverzeichnis	52

1. Einleitung

Leguminosen spielen in der Landwirtschaft eine wichtige Rolle. Einerseits haben sie große wirtschaftliche Bedeutung und andererseits kommt dieser Pflanzenfamilie auch große ökologische Bedeutung zu. Die wirtschaftliche Bedeutung liegt vor allem in den hohen Proteingehalten der Samen, welche sie für die tierische aber auch für die menschliche Ernährung interessant machen. Die Grundlagen für die hohen Proteingehalte liefert eine optimale Stickstoffversorgung, welche durch eine Symbiose mit luftstickstofffixierenden Bakterien (*Rhizobium*-, *Bradyrhizobium*- und *Azorhizobium*-Stämme) erreicht wird. Diese Symbiose ermöglicht den Leguminosen den wichtigsten Pflanzennährstoff, Stickstoff, über die Luft zu beziehen.

Betrachtet man die enormen Stickstoffmengen, die symbiontisch fixiert werden können in Tab. 1, wird klar, warum großes Interesse am Verständnis der biologischen Stickstofffixierung besteht.

Tab. 1: N₂-Fixierung durch Fabales; Quelle: WERNER (1999)

Spezies	Fixierung kg N/ha/J Grenzwerte	Durchschnittswerte	% Anteil der BNF an der N-Assimilation
Klee	45-670	250	80
Ackerbohne	100-450	200	75
Luzerne	90-340	150	70
Erbse	50-300	150	70
Lupine	140-200	150	95
Sojabohne	60-300	100	50
Buschbohne	40-100	70	40

Dieses Potential der N₂-Fixierung kann in der pflanzlichen Produktion in vielerlei Hinsicht genutzt werden. So zum Beispiel sind viele Leguminosenarten im ökologischen Landbau ein essentieller Bestandteil von Fruchtfolgen um die Bodenfruchtbarkeit nachhaltig aufrechterhalten zu können. Durch die ausgezeichnete Vorfruchtwirkung der Leguminosen kann die Stickstoffdüngung in den Nachfolgekulturen auf ein Minimum reduziert werden.

Diese und viele andere Gründe erklären warum ein vollkommenes Verständnis der Funktion der Symbiose in der Pflanzenzüchtung von großem Interesse ist.

Eine auf dem Weltmarkt sehr wichtige Leguminosenart ist die Sojabohne (*Glycine max* L. Merrill), welcher in den letzten Jahren auch in Österreich größere Aufmerksamkeit geschenkt wird. Im Jahr 2006 betrug die Anbaufläche in Österreich laut FAOSTAT (2008) bereits über 25000 ha, im Vergleich dazu, zehn Jahre zuvor 1996, lag die Anbaufläche nur bei 13315 ha. Die Anbauggebiete in Österreich liegen vor allem in den milden Klimaregionen, wie im Burgenland aber auch in Oberösterreich.

Die Sojabohne gilt als eine der am besten erforschten Agrarpflanzen und wird auch in zahlreichen Studien für die Forschung rund um die Stickstofffixierung eingesetzt.

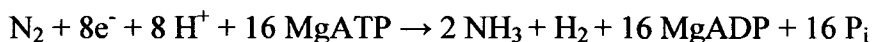
2. Literaturübersicht

Mit diesem Kapitel soll ein Einblick in die Biologische Stickstoff-Fixierung und ein kurzer Überblick über die Systematik, Botanik und nichtnodulierende Mutanten der Sojabohne gegeben werden. Zusätzlich werden noch einige Anwendungsmöglichkeiten der Image-Analyse beschrieben.

2.1. Biologische Stickstoff-Fixierung

Die biologische Stickstoff-Fixierung ist auf Prokaryoten beschränkt. Eukaryoten, einschließlich höherer Pflanzen, die diese grundlegende Assimilationsleistung nutzen, können dies nur durch eine Symbiose erreichen. In der Evolution ist dieser Weg mehrfach beschritten worden: stickstofffixierende Cyanobakterien sind Symbiosepartner in Flechten und z.B. in dem in Reiskulturen genutzten Schwimmpflanz *Azolla*. Actinomyceten sind Symbiosepartner bei stickstofffixierenden Bäumen wie Erlen und *Casuarina*. *Rhizobium*-, *Bradyrhizobium*- und *Azorhizobium*-Stämme sind Symbiosepartner von Leguminosen.

Die N₂-Fixierung in freilebenden wie in symbiotisch vergesellschafteten Mikrosymbionten folgt der allgemeinen Gleichung:



Die N₂-Fixierung ist deutlich energieaufwendiger als die CO₂-Fixierung.

Da die Nutzung der biologischen Stickstofffixierung in der Landwirtschaft ganz überwiegend durch die Symbiose von Leguminosen mit Stämmen von *Rhizobium* und *Bradyrhizobium* erreicht wird, kommt der Entwicklung dieser Symbiose eine grundlegende Bedeutung für die Nutzung der biologischen Stickstofffixierung zu. In Leguminosenknöllchen ist die biologische Stickstofffixierung sauerstofflimitiert und nicht kohlenstofflimitiert.

In der Tab. 2 ist der Wirtsbereich der Knöllchenbildung durch die Gattungen *Rhizobium* und *Bradyrhizobium* dargestellt (WERNER, 1999).

Tab. 2: Wirtsbereich der Knöllchenbildung durch die Gattungen *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*; Quelle: WERNER (1999)

Wirtspflanze	<i>Rhizobium leguminosarum</i> Biovar viciae	Biovar trifolii	Bivar phaseoli	<i>Rhizobium meliloti</i>	<i>Rhizobium loti</i>	<i>Rhizobium fredii</i>	<i>Rhizobium</i> sp. (<i>Galega</i>)	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	<i>Bradyrhizobium</i> sp. (<i>Vigna</i>)	<i>Bradyrhizobium</i> sp. (<i>Lupinus</i>)
<i>Pisum sativum</i>	●	+ -	+ -	-	-			-	-	-
<i>Vicia sativa</i>										
<i>Vicia faba</i>										
<i>Phaseolus vulgaris</i>	+ - -	+ - -	●	-	+ -			+ -	+ -	+ - -
<i>Trifolium repens</i>	+ -	●	+ - -	-	-			-	-	-
<i>Lotus corniculatus</i>	-	-	-	-	●			-	-	-
<i>Medicago sativa</i>	-	-	-	●	+ - -			-	-	-
<i>Macroptilum atropurpureum</i>	-	-	+ -	-	+ -			+ -	+ -	+ - -
<i>Glycine max</i>	-	-	-	-	-	+ -		●	+ -	+ - -
<i>Glycine soja</i> ¹	-	-	-	-	-	●		+ -	+ -	+ - -
<i>Vigna sinensis</i>	-	-	-	-	-			+ -	+ -	+ - -
<i>Ornithopus sativus</i>	-	-	-	-	-			-	-	●
<i>Galega sp.</i>	-	-	-	-	-		●	-	-	-

¹ Wildform der Sojabohne

- mehr als 90 % der isolierten Stämme dieser Gruppe nodulieren mit effektiven (fix+) Knöllchen
- + - 20 – 90 % der Stämme nodulieren, in vielen Fällen jedoch ineffektiv (fix-)
- + - - weniger als 20 % der Stämme nodulieren, mit in der Regel ineffektiven (fix-) Knöllchen
- keine Nodulation

Laut MARTINEZ-ROMERO (1994) ist *Glycine max* zusätzlich noch Wirtspflanze für die Arten *Bradyrhizobium elkanii* und *Rhizobium xinjiangensis*.

Früher wurden alle Rhizobienarten von Mikrobiologen unter einer gemeinsamen Gattung, *Rhizobium*, zusammengefasst, welchen man in schnell- und langsamwachsende Arten untergliederte. In den 80er Jahren fasste man dann alle langsamwachsenden Arten unter einer neuen Gattung, *Bradyrhizobium*, zusammen. Schnell wachsend sind zum Beispiel *Rhizobium meliloti* und *Rhizobium leguminosarum*, hingegen langsam wachsend sind die Arten *Bradyrhizobium japonicum* und *Bradyrhizobium lupini* siehe, POSTGATE (1998).

2.2. Entwicklung der Symbiose

Die Entwicklung der Symbiose beruht auf einem chemischen Dialog zwischen der Pflanzenwurzel und dem Bakterium. Die Pflanze beginnt den Dialog wenn ihre Wurzeln Flavonoide ausscheiden; diese pflanzlichen Naturstoffe dringen in die Zellen von Rhizobien ein, die in der Nähe leben. Die Spezifität dieses Signals beruht auf der Flavonoidstruktur, da eine bestimmte Leguminosenart ein spezifisches Flavonoid ausscheidet, das nur von einer bestimmten *Rhizobium*-Art erkannt und absorbiert wird. Das Signal der Pflanze löst die Bildung eines „Antwortmoleküls“ im Bakterium aus. Das pflanzliche Signalmolekül aktiviert spezifisch ein genregulierendes Protein, das eine Gruppe von Bakteriengen answitcht, die nod-Gene (Nodulationsgene). Die Produkte dieser Gene sind Enzyme, welche die Bildung von artspezifischen Molekülen katalysieren, den so genannten Nod-Faktoren („Nodulationsfaktoren“). Die Nod-Faktoren werden von den Bakterien ausgeschieden und wirken als Antwortsignal, indem sie die Wurzel zur Bildung des Infektionsschlauchs anregen. Durch diesen kann *Rhizobium* eindringen und die Knöllchenbildung veranlassen. Die Reaktionen der Pflanze erfordern die Aktivierung von so genannten frühen „Nodulingenen“, vermutlich durch genregulierende Signalübertragungswege. Nodulingene (enod) werden vom pflanzlichen Symbiosepartner in den Knöllchenzellen exprimiert; die codierten Proteine heißen Noduline (vgl. CAMPBELL und REECE, 2003).

Zahlreiche Forschungsarbeiten beschäftigten sich in den letzten Jahrzehnten mit der Aufklärung der Funktion der Symbiose. Mehr als 100 für die Symbiose essentielle Gene auf Seiten der Rhizobien und der Leguminosen-Wirtspflanzen sind bereits bekannt.

Die bei *Rhizobium* und *Bradyrhizobium* zur Symbioseentwicklung erforderlichen nachgewiesenen Gene sind in der Tab. 3 zusammengefasst. Am besten untersucht sind die Nodulationsgene (nod-Gene), von denen inzwischen über 30 bekannt sind (WERNER, 1999).

Tab. 3: Zur Symbioseentwicklung erforderliche Gene in *Rhizobium/Bradyrhizobium*;
Quelle: WERNER (1999)

Gene	Bezeichnung	Funktion
hac	Hair Curling	Curling von Wurzelhaaren
nod	Nodulation	Auslösung der Nodulationsentwicklung
nsn	Wirtsspezifität der Nodulation	Bestimmung der Wirtsspezifität innerhalb der Infektionsgruppen
efn	Nodulationseffizienz	Zusätzliche Gene für Nodulationseffizienz
ndv	Knöllchenentwicklung	Regulierung der Infektion und Freilassung der Bakterioide
exop	Extrazelluläre Polysaccharide	Regulierung der Infektion und Freilassung der Bakterioide
nif	Stickstoff-Fixierung	An der Stickstoff-Fixierung beteiligte Gene mit Homologie zum Gen-Custer von <i>Klebsiella</i>
fix	Fixierung	In der Stickstoff-Fixierung beteiligte zusätzliche Gene im symbiotischen Stadium (ohne Homologie mit <i>Klebsiella</i> nif-Genen)
dct	Dicarbonsäure-Transport	Transport von Dicarbonsäuren als Substrat für die Bakteroiden-Stickstoff-Fixierung)

Bei zu niedrigen Temperaturen von unter 25°C kommt es laut ZHANG et al. (1996) zu einer Hemmung der Expression der nod-Gene von *Bradyrhizobium japonicum*. Niedrige Temperaturen hemmen die Biosynthese von Genistein in Sojapflanzen, dies bedingt eine Reduktion der Nodulierung und eine Verzögerung des Beginns der Stickstofffixierung.

2.3. Knöllchentypen

Die Knöllchen sind gekennzeichnet durch hohe Konzentrationen von Phytohormonen. Sie sind physiologisch und morphologisch in zwei verschiedene Kategorien zu trennen:

- Zylindrische Knöllchen mit einem nicht determinierten Wachstumstyp, wie in den Gattungen *Vicia* und *Pisum*. Die N-Transportformen in diesen Knöllchen sind Amide.
- Knöllchen mit einem sphärischen Habitus und einem determinierten Wachstums, charakteristisch für die Gattungen *Phaseolus* und *Glycine*. Die N-Transportform in diesen Knöllchen sind Ureide (WERNER, 1999).

Tab. 4: Hauptunterschiede zwischen indeterminierten und determinierten Knöllchentypen;
Quelle: HIRSCH (1992)

Merkmal	Indeterminierter Knöllchentyp	Determinierter Knöllchentyp
Ort der anfänglichen Zellteilung	Innere Rindenschicht	Äußere Rindenschicht
Knöllchenwachstum	Zellteilung; persistentes Meristem	Zellvergrößerung
Effekte der <i>lps</i> Mutation	Fix-, oder +, normal in gesamter Erscheinung	Fix-, fehlgebildete Knöllchen
Effekte der <i>exo</i> Mutation	Fix-, „leere“ Knöllchen	Fix+, normale Knöllchen
Infection thread	ausgebreitet	begrenzt
Ursprung	Gemäßigte Klimazonen	Subtropische und tropische Regionen
Transport	Amide	Ureide
<i>nod</i> -Gen Auslöser	Flavone, Flavonoide	Hauptsächlich Isoflavone
Beispiele	Luzerne, Erbse, Wicke	Sojabohne, Bohne, <i>Lotus</i>

2.4. Sojabohne

2.4.1. Systematik und Herkunft

Die Sojabohne gehört zur Ordnung der *Leguminosae* (Hülsenfrüchtler), zur Familie der Fabaceen und zur Gattung *Glycine* WILLD. Die kultivierte Art ist als *Glycine max* (L.) Merr. eingestuft. Die Grundzahl der Chromosomen ist $n = 20$. Es treten recht häufig haploide, triploide, tetraploide, hexaploide sowie aneuploide Formen mit $2n = 78$ und 38 Chromosomen auf. Ohne Fertilitätsstörungen können nur die beiden Arten *Glycine soja* und *Glycine max* im Subgenus Soja miteinander gekreuzt werden.

Die heute angebaute Kultursojabohne (*Glycine max*) stammt von der Art *Glycine soja*, die in Ostasien beheimatet ist. Man vermutet, dass als Herkunftsgebiet (Genzentrum) die Mandschurei mit den angrenzenden Teilen Chinas und Koreas in Frage kommt (SOLDATI, 1999).

2.4.2. Morphologie

Die Sojabohne ist eine einjährige Pflanze, meist aufgerichtet, die je nach Sorte und Anbaugbiet eine Pflanzenhöhe zwischen 30 und 150 cm erreichen kann. Es sind Formen mit zahlreichen Seitentrieben bekannt, obwohl die meisten Kultursorten nur wenige Seitentriebe aufweisen. Die Wildformen neigen stark zur Bildung von Ranken.

Das Wurzelsystem ist gekennzeichnet durch eine nicht allzu stark differenzierte Hauptwurzel (modifizierte Pfahlwurzel) und zahlreiche Seitenwurzeln, sowie aus vielen Kronen- oder Adventivwurzeln. Der Hauptanteil der Wurzeln befindet sich in der obersten Bodenschicht von 15 - 20cm (Lateralwurzeln): ihm kommt die größte Bedeutung für die Aufnahme der Nährstoffe und des Wassers zu.

Man unterscheidet vier verschiedene Blattformen: das erste Kotyledonenblattpaar (oder Keimblattpaar); das erste Blattpaar bestehend aus einfachen ovalen Blättern, die aus dem ersten Knoten oberhalb der Keimblätter entstehen; die dreizähligen Blätter; die alternierend am Haupttrieb gebildet werden sowie die Prophyllen.

Die Blüten (meistens traubenförmig angeordnet) sind klein, weiß oder violett.

Die Hülsen sind meistens leicht gebogen und mit Haaren bedeckt. Sie enthalten 1-4 grüne, gelbe oder schwarze Körner, wobei die meisten Kultursorten gelbe Körner aufweisen. Die Samengröße variiert in weiten Grenzen (TKG zwischen 45 und 480 g, kultivierte Sorten zwischen 160 und 240 g).

In Bezug auf Wuchstypen ist zwischen determinierten und indeterminierten Pflanzen zu unterscheiden. Bei den indeterminierten Typen wächst die Pflanze auch nach dem Blühbeginn weiter. Bei den determinierten Sorten stellt sich dagegen unter optimalen Wachstumsbedingungen ein Wachstumsstop des Haupttriebes nach dem Erscheinen der ersten Blüten ein (SOLDATI, 1999).

2.5. Nichtnodulierende Sojabohnen

Die erste Beschreibung von fehlender Nodulierung im Zusammenhang mit der Sojabohne geht auf WILLIAMS und LYNCH (1954) zurück. 1947 entdeckte man zufällig bei einem Ertragstest der Kreuzung Lincoln x (Lincoln x Richland) in Urbana und Stonington, USA, dass alle angebauten Wiederholungen der Kreuzung, trotz Inokulation des Saatgutes mit *Bradyrhizobium japonicum*, hellgrüne Blätter aufwiesen. Der Proteingehalt der Samen lag sehr niedrig und der Ölgehalt dafür höher. Man nahm an, der Grund dafür könnte eine fehlende Nodulierung sein, was durch Untersuchungen bestätigt wurde. Das Fehlen der Nodulierung geht auf eine Mutation zurück. Das Allel für die Nodulierung ist dominant, wobei hingegen das Allel für die Nichtnodulierung rezessiv ist und nur ein Locus (*rj₁*) involviert ist.

Seitdem sind weitere drei Gene, nämlich *Rj₂*, *Rj₃* und *Rj₄*, welche ebenfalls die Nodulierung mit *Bradyrhizobium japonicum* verhindern, beschrieben worden. Diese drei Gene sind im Gegensatz zu *rj₁* allerdings dominant (PRACHT et al., 1993).

Die nichtnodulierenden Mutanten sind wichtige Versuchsobjekte für Forschungszwecke rund um die Stickstofffixierung. Man konzentriert sich vorwiegend auf die Effektivitätssteigerung der Stickstofffixierungsleistung.

Indigene *B. japonicum*-Stämme sind oft sehr ineffektiv bezüglich Stickstofffixierungsleistung daher wird das Saatgut oft mit neuen, in der Fixierungsleistung verbesserten Stämmen inokuliert. In den großen Sojaproduktionsgebieten der USA sind die indigenen Stämme in Bezug auf die Nodulierung allerdings dominant über die verbesserten Stämme. Zahlreiche Studien konzentrieren sich nun darauf, mit Hilfe der nichtnodulierenden Mutanten, die Nodulierung mit indigenen *B. japonicum*-Stämmen auszuschalten und eine Nodulierung mit anderen effektiveren Stämmen zu induzieren siehe (RASOOLY und ISLEIB, 1993).

Auch QUIAN et al. (1996) setzten sich mit diesem Thema auseinander und kamen zum Ergebnis, dass vor allem *Glycine soja* zahlreiche Gene besitzt, welche die Nodulierung mit indigenen Stämmen ausschaltet.

Nach einer Studie von PRACHT et al. (1994) weisen nichtnodulierende Sojabohnen im Vergleich zu nodulierenden einen geringeren Proteingehalt, dafür aber einen höheren Ölgehalt in den Samen auf. Das Samengewicht ist ebenfalls geringer.

2.6. Image-Analyse

Die Image-Analyse, zu Deutsch Bildanalyse, ist eine Methode, mit der Objekte in verschiedenster Weise untersucht werden können. Beispiele für Anwendungsgebiete sind die Untersuchung von Lebensmitteln, die Beobachtung von Zellwachstum in einer Zellkultur und zahlreiche andere Anwendungsmöglichkeiten in biologischen Disziplinen und der Lebensmittelqualitätskontrolle siehe (HATEM und TAN, 2003).

Der Ausgangspunkt für Bildanalysen sind digitale Fotos, deren Bildinformation in Pixel gespeichert wird.

2.6.1. Anwendungsmöglichkeiten

Wie schon erwähnt wird die Image-Analyse häufig in biologischen Disziplinen angewandt. In diesem Punkt werden kurz einige Anwendungsgebiete für die agrarwissenschaftliche Forschung beschrieben.

In einer Studie von ADAMSEN et al. (2000) wird die Anwendung der Image-Analyse für die Zählung der Blütenanzahl in *Lesquerella* beschrieben. Das Abzählen der Blüten von Hand ist sehr zeitaufwändig und es kann zu Beschädigungen der Blüten kommen. Die Image-Analyse hingegen ist eine rasche und zerstörungsfreie Methode. Zuerst wurden Fotos gemacht und diese wurden, um die Blüten zählen zu können, so bearbeitet, dass nur die gelben Pixel übrig blieben. Mit Hilfe der gelben Pixel konnte auf die Blütenanzahl geschlossen werden. Diese Methode brachte Ergebnisse, welche stark mit den Ergebnissen der Blütenzählung von Hand korrelierten.

Ebenfalls eingesetzt wurde die Image-Analyse in Untersuchungen über die Bauweise von Wurzelsystemen bei Reispflanzen. Mit der Image-Analyse wurden der Durchmesser, die Position und die Länge der Lateralwurzeln gemessen. Da man mit den zur Verfügung stehenden Programmen, diese Parameter nicht messen konnte, entwickelte man eine neue Software (DE DORLODOT et al., 2005).

Ein weiteres Anwendungsgebiet ist die Untersuchung der Bodenbedeckung. RICHARDSON et al. (2001) beschreiben die Messung der Rasenbedeckung mit Hilfe der Image-Analyse.

Normalerweise wird dafür eine Bonitur von geübten Fachleuten durchgeführt. Für die Image-Analyse wurden hingegen Fotos gemacht und zur Auswertung der digitalen Fotos wurde das Programm Sigma Scan Pro benutzt. Man kam zum Ergebnis, dass sich die Image-Analyse sehr gut für solche Messungen eignet.

Die Image-Analyse wird auch im Zusammenhang mit der Messung von Farben genannt. Ein Beispiel dafür ist die Messung der Farbe von Golfrasen siehe (KARCHER und RICHARDSON, 2003). Für die Auswertung der digitalen Fotos kam ebenfalls das Programm Sigma Scan Pro zum Einsatz, mit dem, unter Verwendung des HSB-Farbraums die Farbtöne gemessen wurden. Die Image-Analyse stellt auch in diesem Forschungsbereich eine Bereicherung dar.

3. Problemstellung

Das Ziel der Diplomarbeit war es herauszufinden, inwieweit die Nodulierung (Bildung von Knöllchen) bzw. die fehlende Nodulierung vegetative Stadien der Sojabohne beeinflusst. Im Zentrum der Untersuchungen standen die Blätter und zwar der Chlorophyllgehalt, die Blattfarbe und die Blattgröße.

Der zweite Schwerpunkt lag in der Evaluierung der Methoden, die für die Untersuchungen verwendet wurden. Da in der Pflanzenzüchtung großer Wert auf zerstörungsfreie Methoden gelegt wird, wurden solche für die Untersuchungen verwendet und miteinander verglichen.

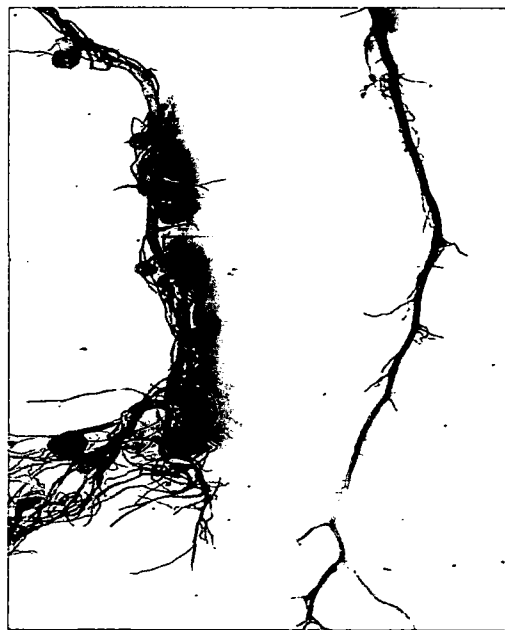


Abb. 1: Wurzeln von Sojapflanzen mit Knöllchen (links) und ohne Knöllchen (rechts)

4. Material und Methoden

4.1. Versuchsmaterial

Als Versuchsmaterial für die drei Experimente dienten 100 verschiedene Genotypen, welche in drei Gruppen zusammengefasst werden können.

Die erste Gruppe umfasst alle homozygoten Genotypen ohne Nodulierung (nod -), die zweite Gruppe umfasst alle heterozygoten Genotypen (nod h) und die dritte Gruppe beinhaltet alle homozygoten Genotypen mit Nodulierung (nod +).

Die Genotypen gingen aus der Kreuzung **BARC 6 x OT 8913** hervor. Der Kreuzungselter BARC 6 ist homozygot nodulierend, während der zweite Kreuzungselter OT 8913 homozygot nicht nodulierend ist. In der F₂-Generation kam es somit zur Aufspaltung der Genotypen in nodulierende (nod +) und nicht nodulierende (nod -) Pflanzen im Verhältnis 3:1. Diese Pflanzen spalteten in den Folgegenerationen weiter in homozygot nicht nodulierende, in heterozygote und in homozygot nodulierende Genotypen auf. Diese wurden dann im Teilrandsch bis zur F₆ (2007) geführt.

4.1.1. Beschreibung der Kreuzungseltern

BARC 6 wurde 1984 von der USDA-ARS in Beltsville, Maryland entwickelt. BARC 6 gilt als eine Linie mit sehr hohen Proteingehalten im Samen und dient hauptsächlich zur Grundlagenforschung in den Bereichen Stickstoff, Protein und Aminosäuremetabolismus. Der Genotyp bringt Pflanzen mit gelben Samen und schwarzen Nabeln hervor, hat violette Blüten und braune Hülsen. Der mittlere Proteingehalt der Samen liegt bei 506g kg⁻¹, ermittelt in 19 verschiedenen Feldprüfungen. BARC 6 ist ein eher spätreifer Genotyp der Reifegruppe III siehe (LEFFEL, 1992).

OT 8913 wurde vom Agriculture Canada, Plant Research Centre in Ottawa, Kanada entwickelt und 1989 freigegeben. Ursprünglich ging die Linie OT 8913 aus 8 unterschiedlichen Linien, welche allesamt nahe verwandt zur Sorte Maple Presto sind, hervor. Maple Presto ist eine frühreife Sorte (000) und kann in Regionen mit kurzer Vegetationszeit angebaut werden. Das wichtigste Kriterium der Linie OT 8913 ist allerdings, dass diese nicht nodulierend ist (Genlocus *rj₁*) und somit interessant für Forschungszwecke rund um die Stickstofffixierung ist (VOLDENG und SAINDON, 1991).

Nachfolgende Tabelle enthält das genetische Versuchsmaterial der durchgeführten Experimente.

Tab. 5: Nodulierung der einzelnen Genotypen in der F₂ (2003) und in der F₆ (2007)

Nr.	Genotyp	nod F ₂ (2003)	nod F ₆ (2007)	Nr.	Genotyp	nod F ₂ (2003)	nod F ₆ (2007)
1	GNN1X-1	nod +	nod h	51	GNN2X-80	nod +	nod h
2	GNN1X-2	nod +	nod +	52	GNN2X-83	nod +	nod +
3	GNN1X-6	nod +	nod h	53	GNN2X-84	nod +	nod h
4	GNN1X-10	nod +	nod h	54	GNN2X-85	nod +	nod h
5	GNN1X-11	nod +	nod h	55	GNN2X-88	nod +	nod h
6	leer			56	GNN2X-90	nod +	nod +
7	GNN1X-13	nod +	nod +	57	GNN2X-92	nod +	nod +
8	GNN1X-14	nod +	nod h	58	GNN2X-93	nod +	nod h
9	GNN1X-16	nod +	nod h	59	GNN2X-95	nod +	nod h
10	GNN1X-22	nod -	nod -	60	GNN2X-96	nod +	nod h
11	GNN1X-28	nod -	nod -	61	GNN2X-98	nod +	nod +
12	GNN1X-29	nod -	nod +	62	GNN2X-99	nod +	nod +
13	GNN1X-30	nod -	nod -	63	GNN2X-100	nod +	nod h
14	GNN2X-32	nod +	nod h	64	GNN2X-101	nod +	nod h
15	GNN2X-34	nod +	nod h	65	GNN2X-103	nod +	nod +
16	GNN2X-35	nod +	nod h	66	GNN2X-104	nod +	nod h
17	GNN2X-37	nod +	nod h	67	GNN2X-105	nod +	nod +
18	GNN2X-38	nod +	nod h	68	GNN2X-107	nod +	nod h
19	GNN2X-39	nod +	nod +	69	GNN2X-108	nod +	nod h
20	GNN2X-41	nod +	nod -	70	GNN2X-110	nod +	nod h
21	GNN2X-42	nod +	nod h	71	GNN2X-111	nod +	nod h
22	GNN2X-43	nod +	nod h	72	GNN2X-113	nod +	nod h
23	GNN2X-44	nod +	nod +	73	GNN2X-114	nod +	nod h
24	GNN2X-46	nod +	nod h	74	GNN2X-115	nod +	nod h
25	GNN2X-48	nod +	nod h	75	GNN2X-116	nod +	nod h
26	GNN2X-49	nod +	nod h	76	GNN2X-117	nod +	nod +
27	GNN2X-50	nod +	nod +	77	GNN2X-118	nod +	nod h
28	GNN2X-51	nod +	nod +	78	GNN2X-119	nod -	nod -
29	GNN2X-52	nod +	nod h	79	GNN2X-122	nod -	nod -
30	GNN2X-53	nod +	nod h	80	GNN2X-123	nod -	nod -
31	GNN2X-54	nod +	nod +	81	GNN2X-125	nod -	nod -
32	GNN2X-55	nod +	nod +	82	GNN2X-127	nod -	nod -
33	GNN2X-56	nod +	nod h	83	GNN2X-128	nod -	nod -
34	GNN2X-57	nod +	nod h	84	GNN2X-129	nod -	nod -
35	GNN2X-58	nod +	nod h	85	GNN2X-130	nod -	nod -
36	GNN2X-59	nod +	nod h	86	GNN2X-131	nod -	nod -
37	GNN2X-61	nod +	nod h	87	GNN2X-132	nod -	nod -

Nr.	Genotyp	nod F ₂ (2003)	nod F ₆ (2007)	Nr.	Genotyp	nod F ₂ (2003)	nod F ₆ (2007)
38	GNN2X-64	nod +	nod +	88	GNN2X-134	nod -	nod -
39	GNN2X-65	nod +	nod h	89	GNN2X-135	nod -	nod -
40	GNN2X-66	nod +	nod +	90	GNN2X-136	nod -	nod h
41	GNN2X-68	nod +	nod +	91	GNN2X-137	nod -	nod -
42	GNN2X-69	nod +	nod h	92	GNN2X-138	nod -	nod -
43	GNN2X-70	nod +	nod h	93	GNN2X-139	nod -	nod h
44	GNN2X-71	nod +	nod h	94	GNN2X-142	nod -	nod -
45	GNN2X-72	nod +	nod h	95	GNN2X-144	nod -	nod -
46	GNN2X-73	nod +	nod +	96	GNN2X-146	nod -	nod -
47	GNN2X-74	nod +	nod h	97	GNN2X-147	nod -	nod -
48	GNN2X-76	nod +	nod h	98	BARC-6	nod +	nod +
49	GNN2X-77	nod +	nod +	99	G425	nod +	nod +
50	GNN2X-79	nod +	nod h	100	OT89-13	nod -	nod -

nod +: Genotypen mit Nodulierung
nod h: Heterozygote Genotypen
nod -: Genotypen ohne Nodulierung

4.2. Versuchsstandort und Versuchsanlage

Als Standort diente der Versuchsgarten der Universität für Bodenkultur in Wien 18.

Der Anbau der Genotypen erfolgte am 20. Juli 2007 in Reihen, mit einem Reihenabstand von 35cm. Die Versuchsanlage (Abb. 2) entsprach einer Gitteranlage mit einem Ausmaß von 11 x 20,5m in 2 Wiederholungen.

7	47 50 72 36 21 45 84 74 83 99										16 23 86 35 20					66 71 54 82 22 24 12 9 7 21 42													
6	13 91 42 4 22 81 92 30 68 37 39 9 2 40 26															2 50 8 100 84 28 27 87 89 4 63 57 43 76													
5	88 25 20 62 5 96 73 29 12 41 3 64 70 82 57															5 92 17 32 77 52 78 1 69 15 49 91 67 64													
4	98 11 100 97 79 87 77 14 16 52 58 31 33 18															73 38 3 19 95 85 30 25 74 40 31 10 56													
3	56 19 54 24 75 49 51 63 28 15 89 23 78 55 93															80 94 75 96 72 51 13 93 34 70 88 48 97 83													
2	80 95 7 53 66 34 27 48 69 43 71 76 67 94 38															11 41 47 59 39 60 45 98 37 33 53 65 14 55													
1	1 17 65 44 86 60 59 8 61 10 46 90 35 32 85															81 44 62 46 58 18 68 61 99 90 79 26 29 36													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29

Wiederholung 1: Schwarz

Wiederholung 2: Rot

Nr.6 fehlend

Abb. 2: Versuchsanlage in Form einer Gitteranlage mit 2 Wiederholungen

4.2.1. Temperatur

Die Temperatur spielt ebenfalls eine Rolle für die Aussagekraft der Experimente. Von Bedeutung sind vor allem die Luft- und Bodentemperatur in den Monaten August bis Oktober. Im August zeigte sich eine relativ normale Durchschnittstemperatur von 20,5°C. Die Tagesdurchschnittstemperatur schwankte nur wenig und so blieb auch die Bodentemperatur bei über 20°C konstant. Gegen Ende des Monats wurde es allerdings kühler. Dies setzte sich im September fort und die Lufttemperatur sank rapide, auf teilweise unter 10°C. Nach kurzer Verzögerung sank auch die Bodentemperatur stark und pendelte sich auf Werte von etwa knapp unter 15°C ein. Anfang Oktober blieb die Bodentemperatur von ca. 15°C durch einen anfänglichen Lufttemperaturaufschwung noch konstant, sank aber später durch kühle Lufttemperaturen auf unter 10°C.

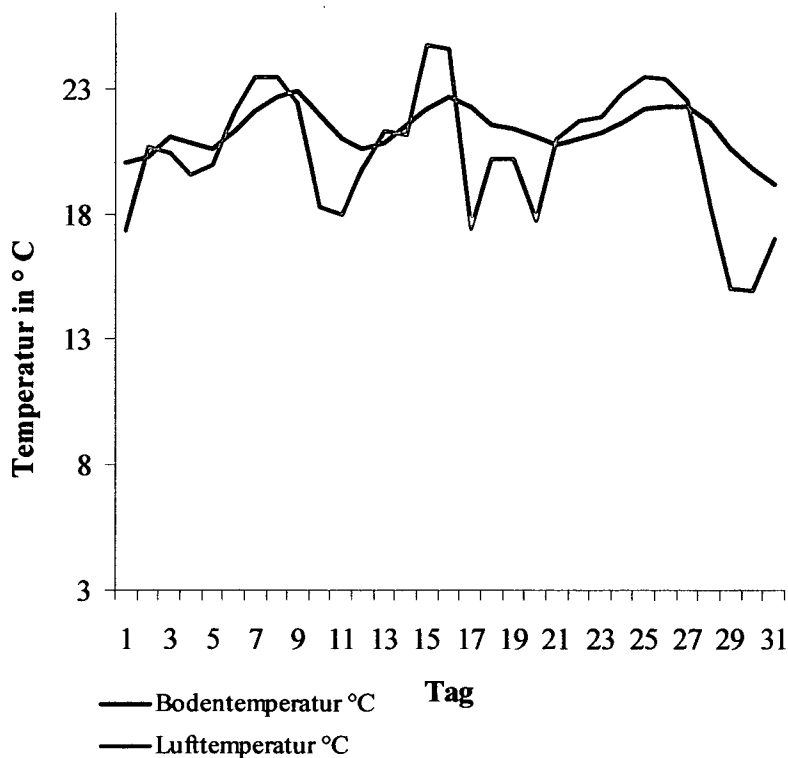


Abb. 3: Durchschnittliche Boden- und Lufttemperatur im Monat August

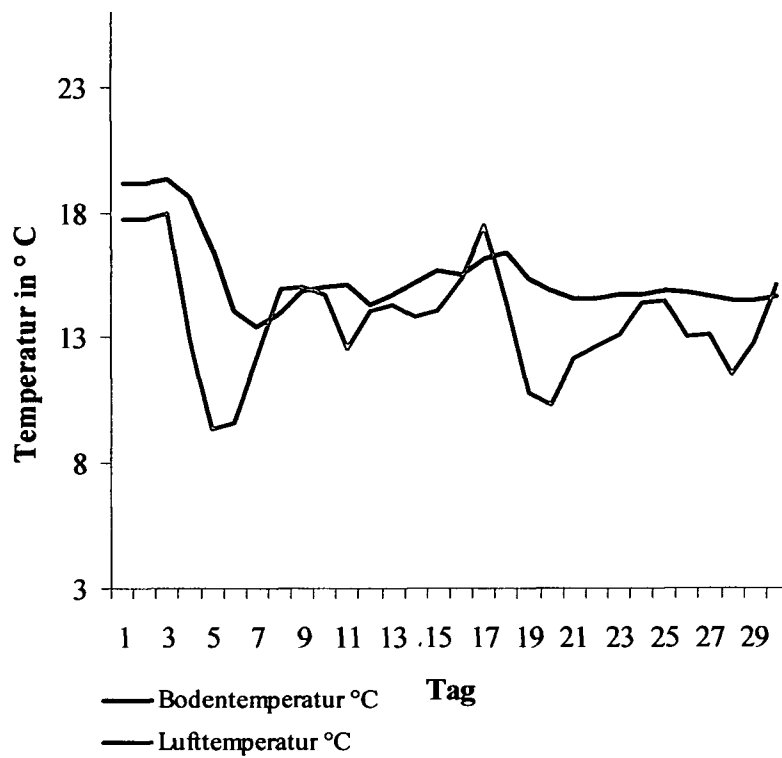


Abb. 4: Durchschnittliche Boden- und Lufttemperatur im Monat September

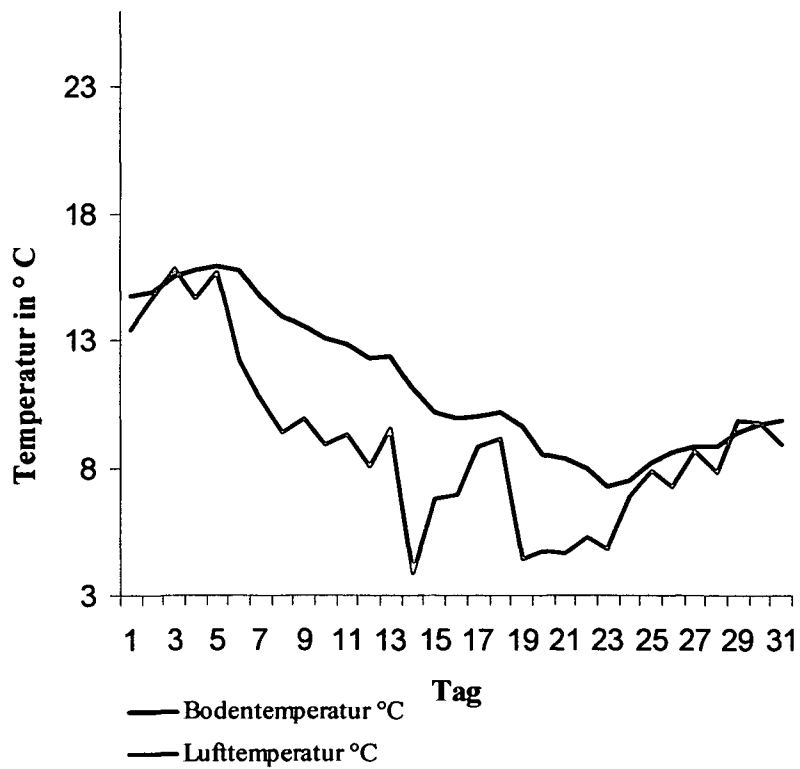


Abb. 5: Durchschnittliche Boden- und Lufttemperatur im Monat Oktober

4.2.2. Boden

Beim Boden handelte es sich um einen nicht natürlich entstandenen Untergrund. Der Boden entstand vermutlich aus Schüttmaterial von verschiedenen Bautätigkeiten. Wichtig zu erwähnen ist, dass auf der Versuchsfläche nie gedüngt wurde um die Knöllchenbildung zu fördern.

4.3. Analyisierte Merkmale

Die Arbeit setzt sich aus drei Experimenten mit unterschiedlichen Fragestellungen zusammen, für welche die Merkmale Knöllchenbildung und die Blattmerkmale Chlorophyllgehalt, Blattfarbe und Blattgröße analysiert wurden.

Nodulierung (Knöllchenbildung)

Die Nodulierung (Knöllchenbildung) wurde festgestellt, in dem 10 Pflanzen jeder Reihe ausgegraben wurden und die Wurzeln optisch auf Knöllchenbildung untersucht wurden. Dies stellte man im Zuge des Experiment 1 fest.

Chlorophyllgehalt

Der Chlorophyllgehalt der Blätter wurde mit einem Hydro N-Tester gemessen.

Blattfarbe

Die Blattfarbe wurde mit Hilfe der Image-Analyse (digitale Fotografie) gemessen. Um die erhaltenen Bilddaten der Digitalkamera in numerische Daten des RGB- und HSB-Farbmodells umzuwandeln, bediente man sich des Programms Sigma Scan Pro Vers. 5.0.

Ebenfalls durchgeführt wurden Messungen mit einem Farbmessgerät (Minolta Chromameter 200b) und eine Bonitur der Blattfarbe.

Blattgröße

Die Blattgröße konnte ebenfalls mit dem Programm Sigma Scan Pro Vers. 5.0 ermittelt werden.

4.4. Hydro N-Tester

In den 80iger Jahren wurde von der Firma Minolta ein kleines, handliches Gerät entwickelt, mit welchem man indirekt den Chlorophyllgehalt von Blättern messen konnte. Neben dem Produkt der Firma Minolta, existieren weitere Produkte anderer Firmen, welche sich nicht wesentlich voneinander unterscheiden, so zum Beispiel der Hydro N-Tester der Firma Yara (in Abb. 6). Ursprünglich war dieses Messgerät für Messungen und Düngeempfehlungen im Getreidebau gedacht, es wird aber auch zur Messung des Chlorophyllgehalts von Blättern bei anderen Kulturpflanzen eingesetzt.

Das zu messende Blatt wird in den Messkopf des Gerätes eingeklemmt, welche zwei lichtemittierende Dioden und eine lichtensitive Silikon-Photodiode auf der gegenüberliegenden Seite beherbergt. Das Funktionsprinzip beruht auf der Durchstrahlung des Blattes bei zwei Wellenlängen und der Erfassung der jeweiligen Absorption. Die erste Wellenlänge liegt im Absorptionsmaximum des Chlorophylls, die zweite befindet sich außerhalb des Absorptionsbereiches photosynthetischer Pigmente und dient als Maß für die Blattdicke und Blattstruktur. Beide Absorptionen werden im Gerät durch einen Algorithmus zu einem gerätespezifischen Wert verrechnet. Das Gerät verrechnet 30 Einzelmessungen zu einem Gesamtwert und fordert bei einer zu weiten Streuung weitere Messungen. Der erhaltene Gesamtwert ist dimensionslos (SCHIEDER, 2004).

Die Vorteile des Hydro N-Testers gegenüber der Bestimmung des Chlorophyllgehalts mit dem Photometer liegen in der zerstörungsfreien und kostengünstigen Messung. Ebenfalls ein großer Vorteil ist die schnelle Bewältigung von großen Mengen an Messmaterial (UDDLING et al., 2007).

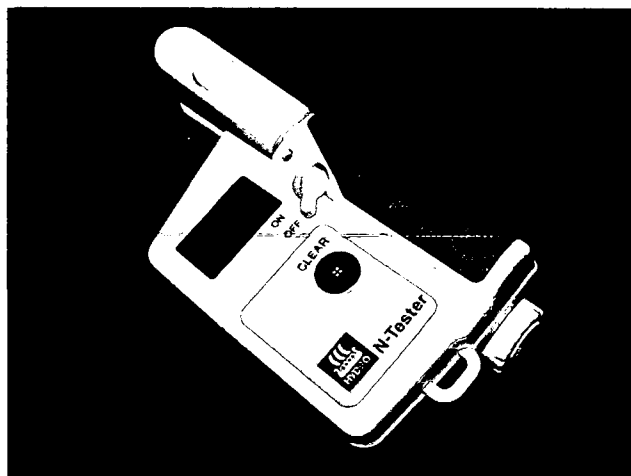


Abb. 6: Hydro N-Tester (Chlorophyllmessgerät)

4.5. Sigma Scan Pro Vers. 5.0

Sigma Scan Pro ist eine Software mit der Bildanalysen durchgeführt werden können. Mit dem Programm können digitale Bilder erfasst, modifiziert und verschiedenste Parameter gemessen werden. Man kann zum Beispiel kleinste Details in Bildern sichtbar machen, Winkel messen, Abstände messen, Flächen messen, Pixel zählen, Bilder überlagern, Farbtöne messen und so weiter. Als nützlich erweist sich die Software vor allem in biologischen Disziplinen (SPSS, 1999).

In den Experimenten wurde das Programm genutzt um die Blattfarbe und zusätzlich in Experiment 2, die Blattgröße zu messen. Das Programm analysierte die Blattfarbe anhand der beiden Farbmodelle RGB und HSB und errechnete mit Hilfe der Anzahl der grünen Pixel der Fotos die Blattgröße.

Das RGB-Farbmodell eignet sich besonders zur Darstellung von Farbbildern am Bildschirm und setzt sich aus den 3 Komponenten Rot, Grün und Blau zusammen. Die Werte liegen zwischen $0 \leq 255$.

Das HSB-Farbmodell kommt dem menschlichen Empfinden näher als das RGB-Farbmodell. Das H steht für Hue (Farbton), das S für die Saturation (Sättigung) und das B für Brightness (Helligkeit). Sämtliche Farbmodelle können mit Einschränkungen ineinander übergeführt werden (PUM, 2006).

Bei normaler Benutzung von Sigma Scan Pro muss jedes einzelne Bild manuell analysiert werden. Dies ist allerdings eine langwierige Prozedur und deshalb wurde ein Makro (erstellt von KARCHER und RICHARDSON, 2005) verwendet, welches die Analyse von größeren Mengen an RGB-, HSB- und Blattgröße-Werten automatisierte. Die zu analysierenden Bilder müssen dieselben Dateieindungen haben und jedes Bild muss eine fortlaufende Nummer besitzen.

4.6. Minolta Chromameter 200b (L*a*b-Farbmessgerät)

Das Chromameter ist ein Farbmessgerät bestehend aus einer Kontrolleinheit und einem Messkopf. Im Messkopf befindet sich eine Hochleistungs-Xenon-Blitzröhre, die für eine konstante und gleichmäßige Ausleuchtung der im Durchmesser 8mm großen Messfläche sorgt (TAUBERT, 2001).

Der L*a*b Farbraum wird oft in der professionellen Grafik verwendet, mit ihm können alle wahrnehmbaren Farben dargestellt werden. L*a*b Farben sind vom Ausgabegerät unabhängig. Sie bestehen aus einer Luminanz- oder Helligkeitskomponente (L) und zwei chromatischen Komponenten: die a-Komponente reicht von grün bis rot und die b-Komponente von blau bis gelb (PUM, 2006).

4.7. Experiment 1

Fragestellung

Beeinflusst der Genlocus rj_1 die Aufspaltung?

Gibt es einen Unterschied im Chlorophyllgehalt bzw. in der Blattfarbe zwischen Genotypen mit Nodulierung, ohne Nodulierung und heterozygoten Genotypen?

Mit welchen direkt am Feld durchgeführten Messmethoden lassen sich Unterschiede erkennen?

Material und Geräte

Das zu untersuchende pflanzliche Ausgangsmaterial in Form der Blätter lieferte die in Abb. 2 dargestellte Gitteranlage. Die Pflanzen befanden sich im Entwicklungsstadium R1 (Blühbeginn). Für das Experiment wurden die Beete eins bis sechs vollständig verwendet. In Tab. 5 sind die einzelnen untersuchten Genotypen bezüglich der Nodulierungsvariante dargestellt.

An Geräten wurde ein Hydro N-Tester (Marke Yara) für die Chlorophyllgehaltsmessungen und eine digitale Fotokamera der Firma Sony (Modell DSC F707) für die Image-Analyse verwendet.

Einstellungen der Digitalkamera: Bildauflösung 640x480; Prog. A; f=2.0

Versuchsdurchführung

Die Durchführung des Experiments erfolgte am 12. 9. 2007.

Mit dem Hydro N-Tester wurden in jeder Reihe 30 Einzelmessungen von verschiedenen Pflanzen des gleichen Genotyps gemacht. Die 30 Einzelmessungen ergaben einen Gesamtwert für den Chlorophyllgehalt.

Mit der Digitalkamera wurde in jede Reihe zwei Mal von oben hinein fotografiert. Der Abstand der Kamera zu den Pflanzen konnte nur geschätzt werden.

Aus den Fotos der Digitalkamera wurden mit Hilfe von Sigma Scan Pro die RGB- bzw. HSB-Werte ermittelt und ein Mittelwert aus den zwei Fotomessungen gebildet.

Zusätzlich wurde noch eine Blattfarbe-Bonitur gemacht, bei der Werte zwischen 1 (hellgrüne Blätter) und 9 (dunkelgrüne Blätter) vergeben wurden.

Die Beete eins bis sechs wurden mit Ausnahme der fehlenden Parzelle 6 vollständig untersucht. Beet sieben konnte auf Grund des schlechten Zustands der Pflanzen nicht untersucht werden.

4.8. Experiment 2

Fragestellung

Gibt es Unterschiede in den Blattmerkmalen Chlorophyllgehalt, Blattfarbe und Blattgröße zwischen homozygot nodulierenden, homozygot nicht nodulierenden und heterozygoten Genotypen?

Mit welchen Messmethoden lassen sich signifikante Unterschiede erkennen?

Material und Geräte

Das Ausgangsmaterial in Form von Blättern wurde von den Blöcken eins bis vier der Gitteranlage (Abb. 2) entnommen. Die Pflanzen befanden sich im Entwicklungsstadium R5 (Beginn der Samenbildung).

Die Messungen wurden mit dem Hydro N-Tester, einer Digitalkamera (Sony DSC 707) und einem L*a*b Farbmessgerät der Firma Minolta (Modell Chroma Meter CR-200b) durchgeführt.

Einstellungen der Digitalkamera: Bildauflösung 640x480; Prog. A, f=2.0

Einstellungen des Farbmessgerätes: Normallichtart 6774 K

Versuchsdurchführung

Das Experiment wurde am 4.10.2007 durchgeführt. Die Messungen wurden im Übungsraum unter definierten Bedingungen gemacht. Für das Experiment wurden fünf Blätter je Reihe geerntet und die Merkmale Chlorophyllgehalt, Blattfarbe und Blattfläche gemessen. Der Chlorophyllgehalt von jedem Genotyp wurde mit dem Hydro N-Tester ermittelt. Für die Feststellung der Blattfarbe und der Blattgröße wurde jedes Blatt auf einem Podest mit rötlichem Hintergrund fotografiert (siehe Abb.7). Die Beleuchtung erfolgte mittels farblosen

Lichts und der Abstand der Kamera betrug 40cm. Aus den Fotos der Digitalkamera wurden mit Hilfe von Sigma Scan Pro die RGB- bzw. HSB-Werte ermittelt und die Blattfläche bestimmt. Aus fünf Messungen wurde ein Mittelwert errechnet.

Die Blattfarbe wurde noch dazu mit dem L*a*b-Farbmessgerät, welches direkt Werte für die einzelnen Farbkomponenten ausgibt, ermittelt.

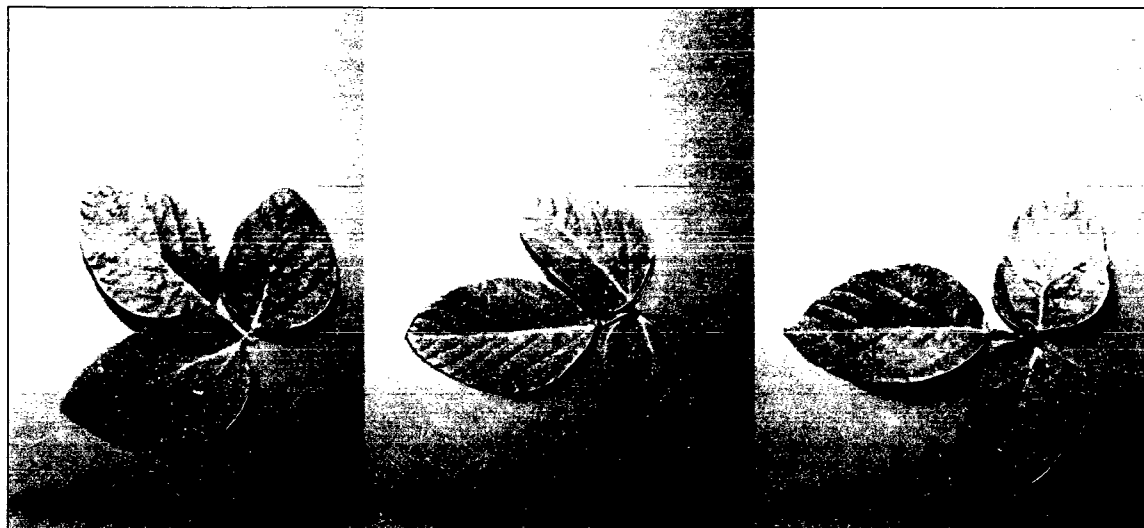


Abb. 7: Blätter der Sojabohne auf rötlichem Hintergrund als Basis für die Image-Analyse

4.9. Experiment 3

Fragestellung

Kann die Image-Analyse eingesetzt werden um den Chlorophyllgehalt mit Hilfe der Farbräume RGB oder HSB vorherzusagen, bzw. gibt es einen Zusammenhang zwischen den Chlorophyllgehaltswerten und den RGB- bzw. HSB-Werten?

Material und Geräte

Das pflanzliche Ausgangsmaterial in Form von Teilblättern der Sojabohnenpflanze lieferte wiederum die in Abb. 2 dargestellte Gitteranlage.

An Geräten wurde eine digitale Fotokamera der Firma Sony (Modell DSC F707) um die Blattfarbe zu messen und ein Hydro N-Tester der Firma Yara um den Chlorophyllgehalt zu messen verwendet.

Einstellungen der Digitalkamera: Bildauflösung 640x480; Prog. A; f=2.0

Versuchsdurchführung

Das Experiment wurde am 29. 10. 2007 durchgeführt. Für die Durchführung wurden 110 möglichst unversehrte Teilblätter von den Sojapflanzen der Gitteranlage geerntet. Die Auswahl der Teilblätter erfolgte unabhängig von der Versuchsanordnung.

Jedes Teilblatt wurde mit dem Hydro N-Tester mit dreißig Einzelmessungen, welche einen Gesamtwert ergeben auf den Chlorophyllgehalt getestet und anschließend mit der Digitalkamera fotografiert. Dazu wurden die Teilblätter auf ein Podest mit rotem Hintergrund gelegt und bei einem Abstand von 40cm fotografiert. Die Beleuchtung erfolgte mittels einer Schreibtischlampe mit weißem Licht und blieb bei jedem Foto gleich.

Die erhaltenen Bilddaten wurden mit Hilfe des Bildanalyseprogramms Sigma Scan Pro Vers. 5.0 in numerische Daten (RGB- und HSB-Werte) überführt um statistische Vergleiche mit den Chlorophyllgehalts-Daten zu ermöglichen.

4.10. Datenauswertung

Für die Auswertung der drei Experimente kamen SPSS Vers.15.0 und Microsoft Excel zum Einsatz.

5. Ergebnisse

5.1. Ergebnisse Experiment 1

5.1.1. Chi-Quadrat-Test

Mit dem Chi-Quadrat-Test wurde geprüft, ob die Aufspaltung der untersuchten Genotypen einer bestimmten Verteilung (3:1 in der F₂ bzw. 1:2:1 in den F₂ abgeleiteten Familien) folgt.

Tab. 6: Chi-Quadrat-Test für die Aufspaltungsverhältnisse von 3:1 (F₂) bzw. 1:2:1 (F₂-abgeleitete Familien)

3:1 Aufspaltung (F ₂)			
	Beobachtet	Erwartet	Chi-square-terms
nod-	22	24,25	0,21
nod+	75	72,25	0,07
		Chi ² =	0,28
		P-Wert =	0,60
1:2:1 Aufspaltung (F ₂ -abgeleitete Familien)			
	Beobachtet	Erwartet	Chi-square-terms
nod-	22	24,25	0,21
nodh	52	48,5	0,25
nod+	23	24,25	0,06
		Chi ² =	0,53
		P-Wert =	0,77

Der Chi-Quadrat Test bestätigt, die Aufspaltungsverteilung der Genotypen von 3:1 in der F₂-Generation und 1:2:1 in den F₂-abgeleiteten Familien.

5.1.2. Varianzanalyse

Mit Hilfe der Varianzanalyse versuchte man herauszufinden, ob es Unterschiede in den Blattmerkmalen zwischen den Genotypen (gruppiert nach Nodulierungsvariante) gibt und welche Messmethoden signifikante Unterschiede erkennen lassen.

Tab. 7: Einfaktorielle Varianzanalyse für die Genotypen, gruppiert nach Nodulierungsvariante (nod -, nod h, nod +) bezüglich der Blattmerkmale bzw. Messmethoden

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
CHLORO	Zwischen	11529,98	2	5764,99	3,89	0,02
	Innerhalb	211788,54	143	1481,04		
BON GRUEN	Zwischen	18,89	2	9,44	3,91	0,02
	Innerhalb	345,74	143	2,42		
R	Zwischen	5,23	2	2,61	0,01	0,99
	Innerhalb	27473,76	143	192,12		
G	Zwischen	2,67	2	1,33	0,01	0,99
	Innerhalb	23985,22	143	167,73		
B	Zwischen	146,90	2	73,45	0,51	0,60
	Innerhalb	20670,76	143	144,55		
HUE	Zwischen	28,22	2	14,11	0,64	0,53
	Innerhalb	3152,89	143	22,05		
SAT	Zwischen	0,01	2	0,00	1,61	0,20
	Innerhalb	0,23	143	0,00		
BRI	Zwischen	0,00	2	0,00	0,01	0,99
	Innerhalb	0,37	143	0,00		

Signifikante Unterschiede zwischen den Genotypen (gruppiert nach Nodulierungsvariante) gibt es im Chlorophyllgehalt bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 2 %.

Ebenfalls signifikant unterscheiden sich die Genotypen in der Bonitur der Blattfarbe (Grün) bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 2 %.

Keine Unterschiede zwischen den Genotypen gibt es in den RGB- und HSB-Werten.

5.1.3. Chlorophyllgehaltsvergleich

Der Chlorophyllgehalt der Genotypen (gruppiert nach Nodulierungsvariante) wurde graphisch in Form eines Box-Plots (Abb. 8) dargestellt.

Man erkennt, dass der Chlorophyllgehalt der Gruppe nod + eindeutig am höchsten ist und der Chlorophyllgehalt der Gruppe nod - am niedrigsten liegt.

Gut zu erkennen ist ebenfalls die größere Streuung der Werte der nod h Genotypen.

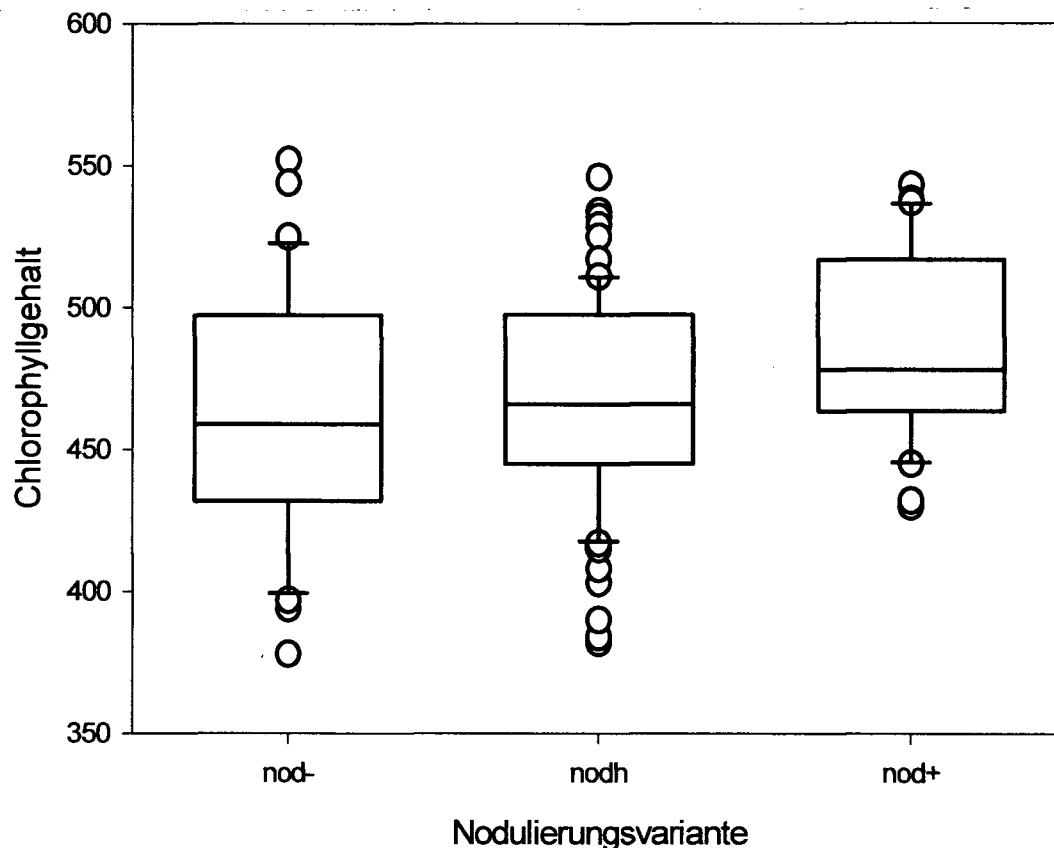


Abb. 8: Blattchlorophyllgehalt der Genotypen (Gruppierung nach Nodulierungsvariante)

Als zweite graphische Darstellung wurde eine kumulative Häufigkeitsverteilung (Abb. 9) gewählt.

In dieser Darstellung kann man ebenfalls erkennen, dass die nod + Genotypen höhere Chlorophyllgehalte aufweisen. Werte unter 400 hingegen erreichen nur Genotypen ohne Nodulierung oder heterozygote Genotypen.

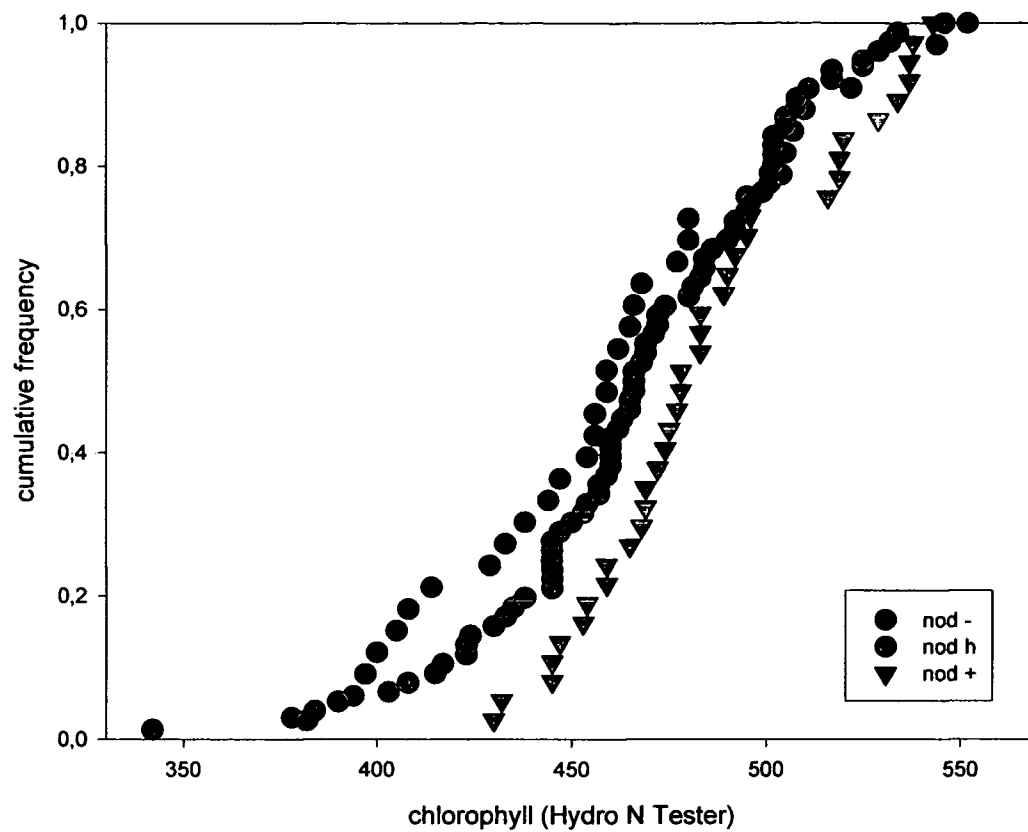


Abb. 9: Blattchlorophyllgehalt der Genotypen ohne Nodulierung (nod -), mit Nodulierung (nod +) und der heterozygoten Genotypen (nod h)

5.1.4. Korrelationsanalyse

Es wurde eine Korrelation nach Pearson durchgeführt, um festzustellen ob es Zusammenhänge zwischen der Blattfarbe (RGB- bzw. HSB-Farbmodell), dem Chlorophyllgehalt bzw. der Bonitur der Blattfarbe (Grün) gibt.

Tab. 8: Einfache Korrelationen zwischen den Blattmerkmalen bzw. der Messmethoden

	CHLORO	BON GRUEN	R	G	B	HUE	SAT	BRI
CHLORO	1,00	0,29**	-0,39**	-0,52**	-0,26**	0,18*	-0,02	-0,52**
BON GRUEN	0,29**	1,00	-0,35**	-0,27**	-0,07	0,44**	-0,14	-0,27**
R	-0,39**	-0,35**	1,00	0,91**	0,80**	-0,51**	-0,52**	0,91**
G	-0,52**	-0,27**	0,91**	1,00	0,89**	-0,19*	-0,62**	1,00**
B	-0,26**	-0,07	0,80**	0,89**	1,00	0,10	-0,91**	0,89**
HUE	0,18*	0,44**	-0,51**	-0,19*	0,10	1,00	-0,38**	-0,19*
SAT	-0,02	-0,14	-0,52**	-0,62**	-0,91**	-0,38**	1,00	-0,62**
BRI	-0,52**	-0,27**	0,91**	1,00**	0,89**	-0,19*	-0,62**	1,00

** Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

* Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).

Der Chlorophyllgehalt ist positiv mit der Blattfarbe-Bonitur (Grün) korreliert.

Die Blattfarbe-Bonitur (Grün) ist positiv mit der Farbart (Hue) des HSB-Farbmodells korreliert.

Eine perfekte Korrelation gibt es zwischen dem Grün-Ton des RGB-Farbmodells und der Helligkeit (Brightness) des HSB-Farbmodells.

5.1.5. Graphische Darstellung der Korrelationen

Die Werte der Blattfarbe-Bonitur (Grün) sind positiv mit dem Chlorophyllgehalt korreliert ($r = 0,291$).

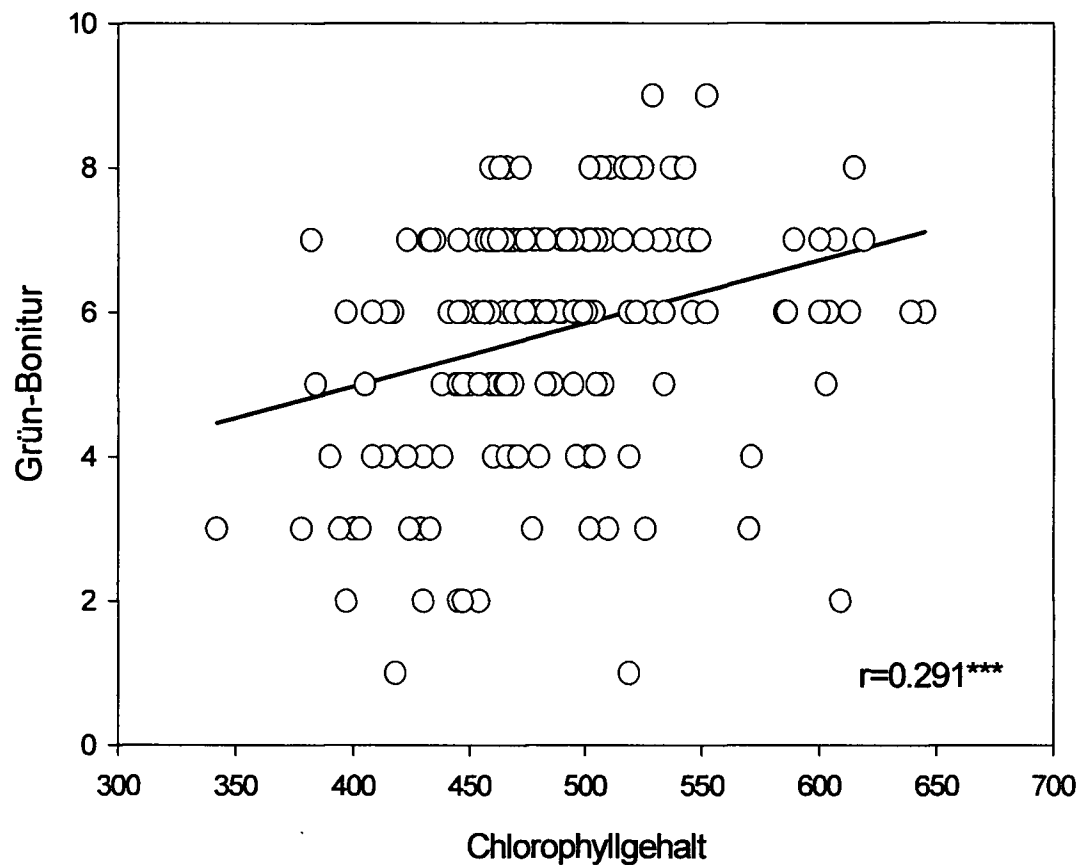


Abb. 10: Korrelation zwischen der Blattfarbe-Bonitur (Grün) und dem Chlorophyllgehalt

Die Blattfarbe-Bonitur (Grün) ist positiv mit der Farbart (Hue) des HSB-Farbmodells ($r = 0,442$) korreliert (siehe Abb. 11).

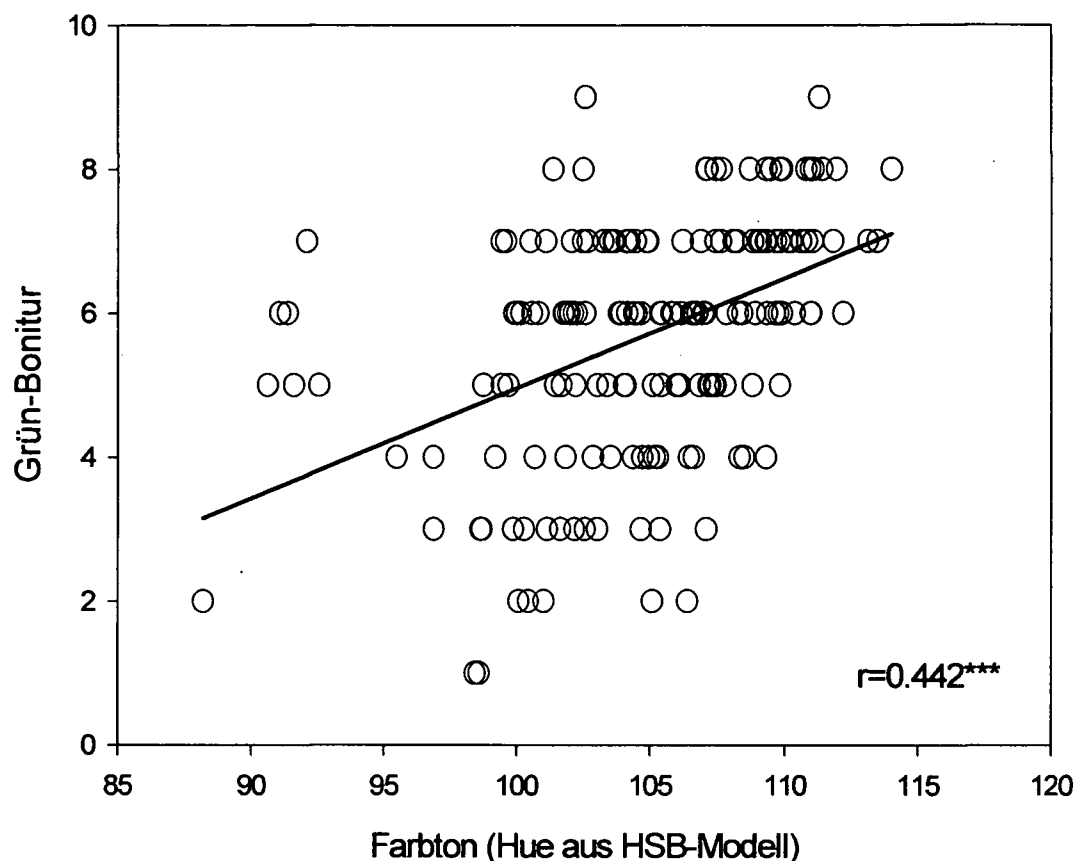


Abb. 11: Korrelation zwischen Blattfarbe-Bonitur (Grün) und dem Farbton (Hue) aus HSB-Farbmodell

5.2. Ergebnisse Experiment 2

5.2.1. Varianzanalyse

Mit Hilfe der Varianzanalyse versuchte man, wie in Experiment 1 herauszufinden, ob es Unterschiede in den Blattmerkmalen zwischen den Genotypen der drei Nodulierungsvarianten gibt und welche Messmethoden signifikante Unterschiede erkennen lassen. Die Messmethoden unterscheiden sich allerdings etwas zu Experiment 1.

Tab. 9: Einfaktorielle Varianzanalyse für die Genotypen, gruppiert nach Nodulierungsvariante (nod -, nod h und nod +), bezüglich Blattmerkmale bzw. Messmethoden

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
L	Zwischen	97,86	2	48,93	0,95	0,39
	Innerhalb	5691,63	111	51,28		
A	Zwischen	1,97	2	0,98	1,04	0,36
	Innerhalb	104,69	111	0,94		
B	Zwischen	61,18	2	30,59	2,93	0,06
	Innerhalb	1159,91	111	10,45		
Stdev L	Zwischen	211,24	2	105,62	0,55	0,58
	Innerhalb	21166,39	111	190,69		
Stdev A	Zwischen	0,37	2	0,18	1,11	0,33
	Innerhalb	18,27	111	0,17		
Stdev B	Zwischen	6,22	2	3,11	2,15	0,12
	Innerhalb	160,35	111	1,45		
CHLORO	Zwischen	6964,51	2	3482,25	1,20	0,30
	Innerhalb	320967,25	111	2891,60		
COVER	Zwischen	4,90	2	2,45	0,48	0,62
	Innerhalb	566,91	111	5,11		
RED	Zwischen	5,19	2	2,60	0,04	0,97
	Innerhalb	8007,14	111	72,14		
GREEN	Zwischen	512,45	2	256,22	1,09	0,34
	Innerhalb	26093,57	111	235,08		
BLUE	Zwischen	445,52	2	222,76	4,91	0,01
	Innerhalb	5032,73	111	45,34		
HUE	Zwischen	78,43	2	39,22	2,55	0,08
	Innerhalb	1705,20	111	15,36		
SAT	Zwischen	0,01	2	0,00	2,67	0,07
	Innerhalb	0,16	111	0,00		
BRI	Zwischen	0,01	2	0,00	1,09	0,34
	Innerhalb	0,40	111	0,00		
Stdev Cover	Zwischen	3,05	2	1,53	2,17	0,12
	Innerhalb	78,21	111	0,71		
Stdev Red	Zwischen	28,99	2	14,50	1,83	0,17
	Innerhalb	878,84	111	7,92		
Stdev Green	Zwischen	13,55	2	6,77	0,96	0,39
	Innerhalb	785,92	111	7,08		
Stdev Blue	Zwischen	27,47	2	13,73	3,10	0,05
	Innerhalb	491,32	111	4,43		
Stdev Hue	Zwischen	11,65	2	5,82	3,37	0,04
	Innerhalb	191,95	111	1,73		
Stdev Sat	Zwischen	0,00	2	0,00	3,89	0,02
	Innerhalb	0,02	111	0,00		
Stdev Bri	Zwischen	0,00	2	0,00	0,96	0,39
	Innerhalb	0,01	111	0,00		

Einen hoch signifikanten Unterschied zwischen den Genotypen (gruppiert nach Nodulierungsvariante) gibt es nur in der Blattfarbe und zwar im Blau-Ton des RGB-Farbmodells.

Signifikante Unterschiede zwischen den Genotypen lassen auch die Standardabweichungen des Blau-Tons (Blue), der Farbart (Hue) und der Sättigung (Saturation) erkennen.

Schwach signifikant unterscheiden sich die Genotypen (gruppiert nach Nodulierungsvariante) in der Farbart (Hue) des HSB-Farbmodells, in der Sättigung (Saturation) des HSB-Farbmodells und in der b-Komponente des L*a*b-Farbmodells.

Keine Unterschiede gibt es im Chlorophyllgehalt und in der Blattgröße.

5.2.2. Mittelwertsvergleich

Tab. 10: Mittelwertsvergleiche der signifikanten Blattmerkmale bzw. Messmethoden und Standardabweichungen

	Nod. Variante	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Min.	Max.
					Lower Bound	Upper Bound		
B	1	25,62	4,29	0,84	23,89	27,35	16,34	36,58
	2	24,76	3,09	0,40	23,95	25,57	18,58	36,02
	3	23,54	2,29	0,42	22,67	24,40	17,66	29,24
BLUE	1	55,30	7,74	1,52	52,17	58,42	42,14	69,93
	2	58,81	6,43	0,84	57,13	60,48	43,34	78,16
	3	60,95	6,38	1,18	58,52	63,37	42,04	73,80
HUE	1	107,95	5,53	1,08	105,72	110,19	98,82	121,68
	2	109,53	3,50	0,46	108,62	110,45	101,55	118,27
	3	110,29	2,87	0,53	109,20	111,38	104,06	117,22
SAT	1	0,69	0,04	0,01	0,67	0,70	0,59	0,74
	2	0,67	0,04	0,01	0,66	0,68	0,58	0,74
	3	0,66	0,03	0,01	0,65	0,68	0,60	0,75
Stdev Blue	1	4,58	1,92	0,38	3,80	5,36	1,54	8,09
	2	5,78	2,23	0,29	5,20	6,36	1,46	10,47
	3	5,67	1,99	0,37	4,91	6,43	1,63	9,18
Stdev Hue	1	3,16	1,37	0,27	2,61	3,71	1,18	6,88
	2	3,82	1,44	0,19	3,45	4,20	1,66	7,21
	3	3,20	0,93	0,17	2,85	3,56	1,53	4,71
Stdev Sat	1	0,03	0,01	0,00	0,02	0,03	0,01	0,05
	2	0,04	0,01	0,00	0,03	0,04	0,02	0,06
	3	0,03	0,01	0,00	0,03	0,04	0,01	0,07

- 1 nod – Genotypen
- 2 nod h Genotypen
- 3 nod + Genotypen

Die nod + Pflanzen (3) zeigen den höchsten Mittelwert für den Blau-Ton (RGB-Farbmodell) mit 60,9453 und den größten Wert für die Farbart (Hue) des HSB-Farbmodells mit 110,29.

Auffällig ist auch, dass die nod h Pflanzen (2) die größten Mittelwerte für die Standardabweichungen zeigen.

Die kumulative Häufigkeitsverteilung (Abb. 12) zeigt, dass die nodulierenden Genotypen fast durchwegs die höchsten Werte für den Blau-Ton (RGB-Farbmodell) aufweisen. Die niedrigsten Blau-Ton-Werte weisen die nichtnodulierenden Genotypen auf.

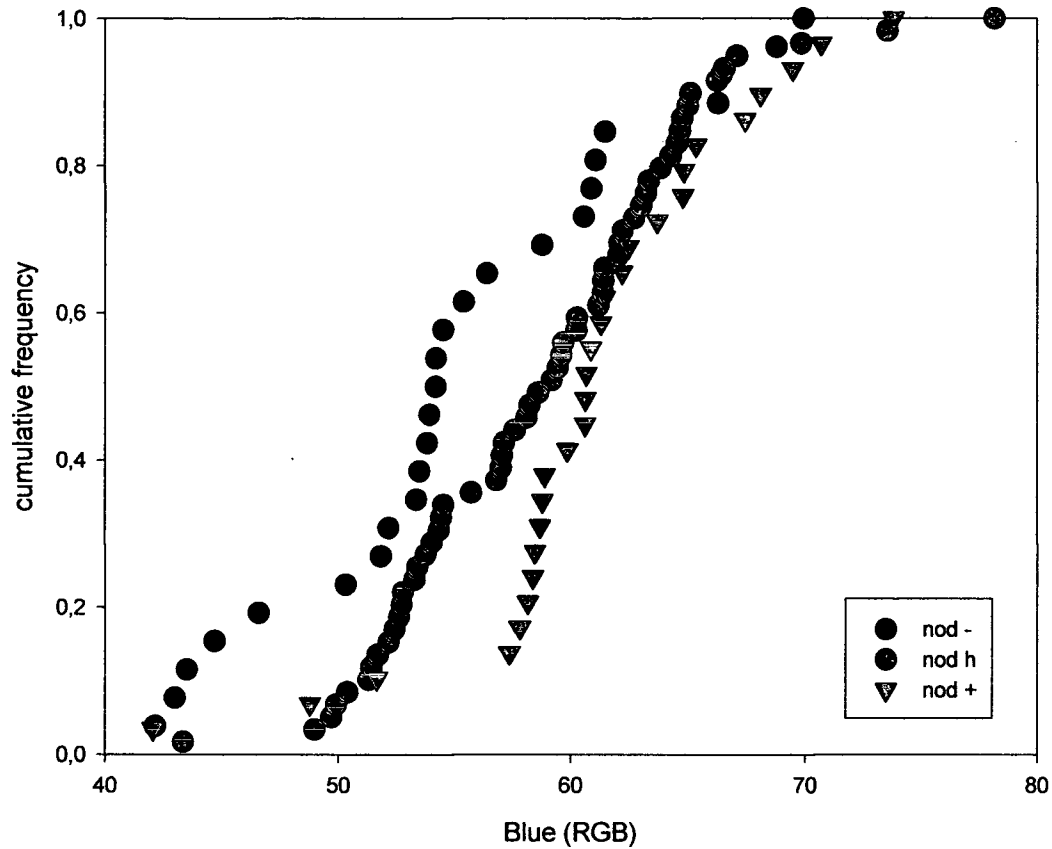


Abb. 12: Blau-Ton Werte (RGB-Farbmodell) der Genotypen ohne Nodulierung (nod -), mit Nodulierung (nod +) und der heterozygoten Genotypen (nod h)

5.3. Ergebnisse Experiment 3

5.3.1. Korrelationssanalyse

Um festzustellen, ob und wie man mit der Image-Analyse (digitale Fotografie) den Chlorophyllgehalt vorhersagen kann, wurde eine Korrelationsanalyse zwischen den untersuchten Merkmalen Chlorophyllgehalt bzw. den Einzelkomponenten der beiden Farbräume RGB und HSB durchgeführt. Die Image-Analyse könnte unter Umständen Chlorophyllgehaltsschätzungen vereinfachen.

Tab. 11: Einfache Korrelationen zwischen dem Chlorophyllgehalt und den RGB- bzw. HSB-Werten

	CHLORO	R	G	B	HUE	SAT	BRI
CHLORO	1,00	-0,83**	-0,65**	0,50**	0,85**	-0,55**	-0,65**
R	-0,83**	1,00	0,63**	-0,27**	-0,96**	0,34**	0,63**
G	-0,65**	0,63**	1,00	-0,50**	-0,60**	0,61**	1,00**
B	0,50**	-0,27**	-0,50**	1,00	0,50**	-0,99**	-0,50**
HUE	0,85**	-0,96**	-0,60**	0,50**	1,00	-0,55**	-0,60**
SAT	-0,55**	0,34**	0,61**	-0,99**	-0,55**	1,00	0,61**
BRI	-0,65**	0,63**	1,00	-0,50**	-0,60**	0,61**	1,00

** Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

Eine besonders auffällige signifikante negative Korrelation gibt es zwischen dem Chlorophyllgehalt und dem Rot-Ton des RGB-Farbmodells.

Der Chlorophyllgehalt korreliert stark positiv mit der Farbart (Hue) des HSB Farbraums.

Ebenfalls stark negativ korreliert sind der Rot-Ton des RGB-Farbmodells mit der Farbart (Hue) des HSB-Farbraums und der Blau-Ton mit der Sättigung (Saturation) des HSB-Farbraums.

Eine perfekte Korrelation gibt es zwischen dem Grün Ton des RGB-Farbmodells und der Helligkeit (Brightness) des HSB-Farbmodells.

5.3.2. Graphische Darstellung der Korrelationen

In Abb. 13 sieht man deutlich, dass die Korrelation zwischen dem Chlorophyllgehalt und dem Rot Ton des RGB-Farbmodells negativ verläuft. Je geringer der Rot Ton in einem digitalen Foto eines Blattes ist, desto höher liegt der gemessene Chlorophyllgehalt.

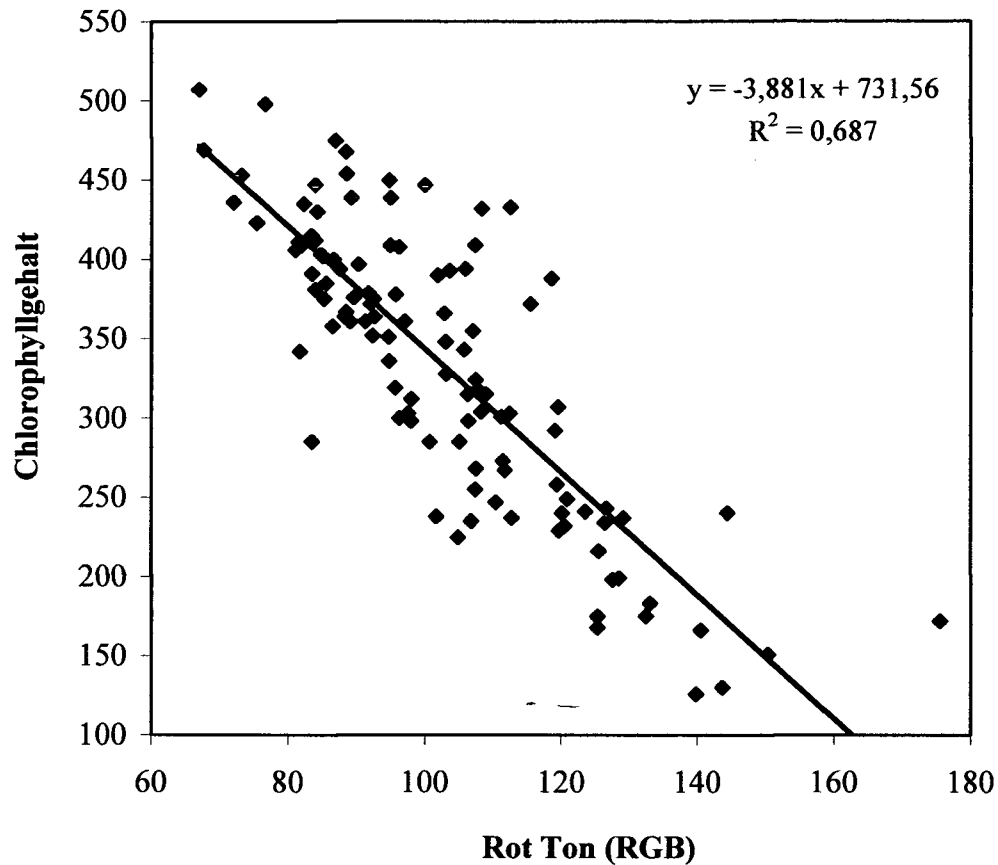


Abb. 13: Zusammenhang zwischen dem Chlorophyllgehalt und dem Rot-Ton des RGB-Farbmodells

Wie aus Abb. 14 hervorgeht, korreliert der Chlorophyllgehalt deutlich positiv mit der Farbart (Hue). Je näher der Wert von Hue an 120 herankommt, desto größer ist auch der Chlorophyllgehalt. Im Farbkreis wird der Farbton durch den Winkel definiert, wobei die Farbart Grün mit 120° dargestellt ist.

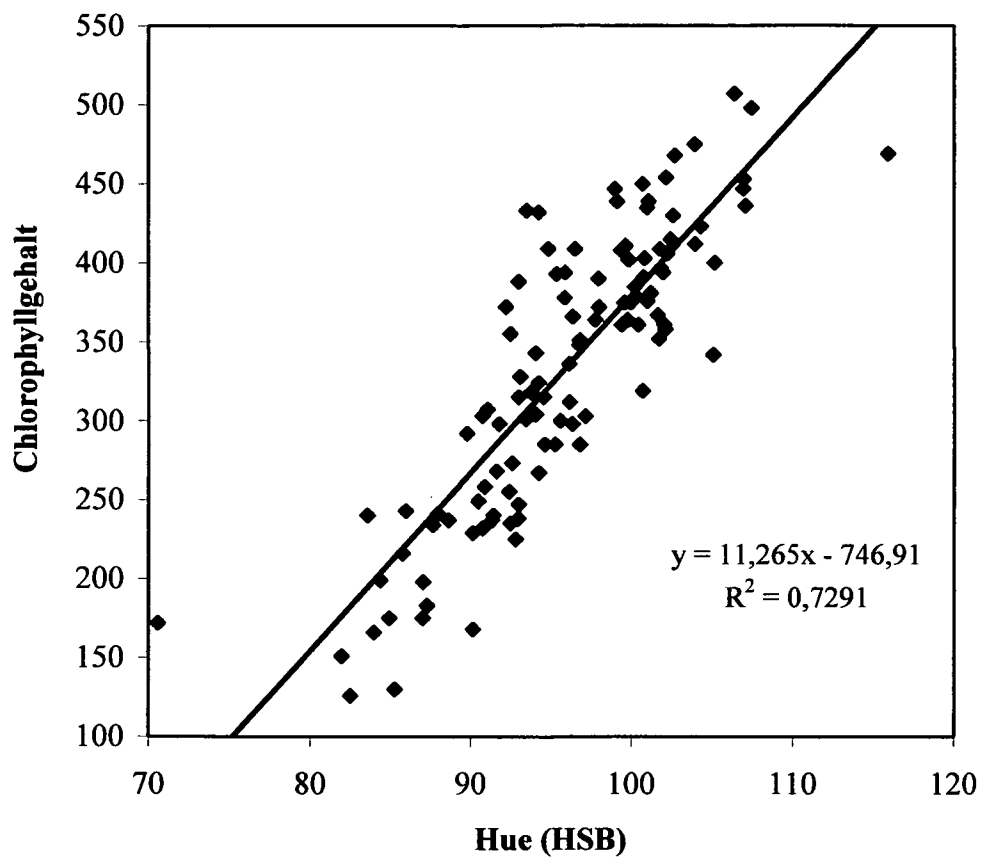


Abb. 14: Zusammenhang zwischen dem Chlorophyllgehalt und der Farbart (Hue) des HSB-Farbmodells

Tab 12: Multiple Regressionsanalyse zwischen dem Chlorophyllgehalt und dem gesamten RGB Farbmodell

Model Summary

Model	r	r Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	0,88	0,77	0,76	43,36

a Predictors: (Constant), B, R, G

ANOVA

Model		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1	Regression	667498,29	3	222499,43	118,34	0,00
	Residual	199291,90	106	1880,11		
	Total	866790,19	109			

a Predictors: (Constant), B, R, G

b Dependent Variable: CHLORO

Der Korrelationskoeffizient r zeigt mit 0,88 eine hoch signifikante Korrelation zwischen dem Chlorophyllgehalt und dem RGB Farbmodell.

6. Diskussion

Als Ausgangsmaterial für die Experimente standen 100 Genotypen mit unterschiedlicher Nodulierung (siehe Tab. 5) zur Verfügung. Diese wurden am 20. Juli 2007 in einer Gitteranlage in zwei Wiederholungen angebaut. Die Experimente 1 und 2 beschäftigten sich mit den Unterschieden der Genotypen hinsichtlich des Chlorophyllgehaltes, der Blattfarbe bzw. Blattgröße und der Aussagekraft der Messmethoden. Das Experiment 3 wurde durchgeführt um zu erkennen inwieweit die Messwerte der Image-Analyse und die Messwerte des Hydro N-Testers zusammenhängen.

6.1. Experiment 1

6.1.1. Aufspaltung

Da es in der Literatur Hinweise darauf gab, dass die Nodulierung im Zusammenhang mit der Pollenmorphologie und der Keimfähigkeit steht, siehe GWATA et al. (2003), könnte es bei der Kreuzung zwischen BARC 6 (nodulierend) und OT 8913 (nicht nodulierend) zu einer von der üblichen (3:1 bzw. 1:2:1 Aufspaltung) abweichenden Aufspaltung gekommen sein. In der Studie wird die geringere Fruchtbarkeit der nicht nodulierenden Genotypen beschrieben. Durch einen Chi-Quadrat-Test für die Aufspaltung konnte dies allerdings für die Kreuzung BARC 6 x OT 8913 nicht bestätigt werden. Die Aufspaltung entsprach dem Erwarteten von 3:1 bzw. 1:2:1.

6.1.2. Chlorophyllgehalt

Grundsätzlich zu erwarten ist, dass nicht nodulierende Genotypen aufgehellte, gelblich wirkende Blätter, wie bei WILLIAMS und LYNCH (1954) beschrieben, zeigen. Grund für die Aufhellung der Blätter ist Chlorose, eine Chlorophyllmangelerscheinung, welche sich unter anderem durch Stickstoffmangel zeigt (WIER und BOETHEL, 1994). In konkretem Fall wird dieser Mangel durch die fehlende Nodulierung ausgelöst. Die Pflanzen befanden sich beim Experiment 1 im Entwicklungsstadium R1 (Blühbeginn), somit stand die gesamte Stickstoffversorgung für die vegetativen Pflanzenteile zur Verfügung. Dies bedeutete eine gute Voraussetzung um Unterschiede zwischen den verschiedenen Genotypen beobachten

bzw. messen zu können. Am deutlichsten zu erkennen waren die Unterschiede im Chlorophyllgehalt. Die höchsten mit dem Hydro N-Tester gemessenen Chlorophyllgehaltswerte wiesen wie erwartet, die nodulierenden Genotypen auf, weil eine gute Entwicklung der Knöllchenbakterien laut SOLDATI (1999) beste Gewähr für eine regelmäßige N-Ernährung der Sojapflanze bietet. Die Blätter der nicht nodulierenden Genotypen hingegen, wiesen den geringsten Mittelwert für den Chlorophyllgehalt auf. Allerdings lagen einige Werte von nicht nodulierenden Genotypen über den der nodulierenden Pflanzen. Die Chlorophyllgehalte der heterozygoten Genotypen siedelten sich in der Mitte an. Bei diesen Genotypen war die Streuung der Werte auf Grund der starken Heterogenität der Pflanzen erwartungsgemäß am größten.

6.1.3. Blattfarbe

Mit der Blattfarbebonitur konnten Unterschiede erkannt werden. Dies gestaltete sich etwas schwieriger, da geringe Unterschiede in der Blattfarbe schwer mit dem Auge auszumachen waren. Korrelationsberechnungen zeigten, dass die Bonitur trotzdem ähnliches ergab, wie die Chlorophyllgehaltsmessungen ($r = 0,291$).

Mit der Image-Analyse (RGB- und HSB-Farbmodell) konnten im ersten Experiment keine Unterschiede zwischen den Nodulierungsvarianten bezüglich der Blattfarbe gezeigt werden. Es gibt allerdings eine positive Korrelation ($r = 0,44$) der errechneten Hue-Werte (HSB-Farbmodell) mit den Blattfarbeboniturwerten. Dies ist nicht verwunderlich, da laut PUM (2006) das HSB-Farbmodell dem menschlichem Empfinden am nächsten kommt.

6.2. Experiment 2

6.2.1. Chlorophyllgehalt

Bei Experiment 2 konnten keine signifikanten Unterschiede im Chlorophyllgehalt zwischen den Nodulierungsvarianten festgestellt werden. Dies ist vermutlich auf die relativ kühlen Luft- und Bodentemperaturen von unter 15° C im Vorfeld von Experiment 2 (siehe Temperaturdiagramm Monat September) zurückzuführen. Laut ZHANG et al. (1996) liegen die optimalen Wurzelzonentemperaturen für die Stickstofffixierung von Sojabohnen zwischen 25 und 30°C. Bei Temperaturen unter 17°C wird die Stickstofffixierung sehr stark gehemmt (ZHANG et al., 1997). Die durch die niedrigen Temperaturen ausgelöste Hemmung der Stickstofffixierung könnte den Vorteil der nodulierenden Genotypen bezüglich

Stickstoffversorgung ausgeschaltet haben, was wiederum die fehlenden Unterschiede im Chlorophyllgehalt zwischen den Nodulierungsvarianten erklären würde.

Ein anderer Grund weshalb man keine Unterschiede messen konnte ist vermutlich das späte Entwicklungsstadium R5 (Beginn der Samenbildung), indem sich die Pflanzen zum Messzeitpunkt befanden. Laut GUFFY et al. (1992) beginnt in der Samenbildungsphase die Umverteilung des Stickstoffs von den vegetativen Pflanzenteilen in die Samen und die Stickstofffixierung wird reduziert. Dies könnte ebenfalls zu helleren Blättern der nodulierenden Genotypen geführt haben und somit zu den nicht vorhandenen Unterschieden zwischen den Genotypen.

6.2.2. Blattfarbe

In Bezug auf das Merkmal Blattfarbe konnten Unterschiede festgestellt werden. Hoch signifikant mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 1 % ist der Unterschied im Blau-Ton (RGB-Farbmodell) zwischen den Nodulierungsvarianten. Den höchsten Blau-Ton Mittelwert haben die nodulierenden Genotypen mit 60,95 und den niedrigsten haben die nicht nodulierenden Genotypen mit 55,30.

Signifikante Unterschiede gibt es auch in den Farbkomponenten Hue und Saturation des HSB-Farbmodells. Hue gilt als die Farbart und wird als Farbkreis von 0° - 360° dargestellt. Den Farben werden Winkel zugeordnet, so zum Beispiel liegt die Farbe Grün bei 120° im Farbkreis. Die Sättigung (Saturation) und die Helligkeit (Brightness), ausgedrückt in Prozent bestimmen wie dunkel die Farbart ist (KARCHER und RICHARDSON, 2003). In Experiment 2 haben die nodulierenden Genotypen den höchsten Mittelwert für Hue mit 110,29 und die nicht nodulierenden den niedrigsten mit 107,95. Bei der Sättigung verhielt sich dies umgekehrt, hier hatten die nicht nodulierenden Genotypen den höchsten Wert.

Mit dem L*a*b Farbraum konnten kaum brauchbare Informationen gewonnen werden, nur in der Farbkomponente b unterschieden sich die Genotypen.

Allgemein kann zur Blattfarbe festgestellt werden, dass nur sehr schwer Aussagen über die Ergebnisse der Image-Analyse getroffen werden können. Am besten geeignet um Aussagen über die Blattfarbe zu treffen, erscheint das HSB-Farbmodell.

6.2.3. Blattgröße

Ebenfalls mit Hilfe der Image-Analyse wurde die Blattgröße analysiert, da vermutet wurde die fehlende Nodulierung könnte auch die Größe der Blätter beeinflussen. Allerdings konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Nodulierungsvarianten festgestellt werden.

6.3. Experiment 3

Korrelationsberechnungen ergaben, dass es Zusammenhänge zwischen den Chlorophyllgehaltswerten (Hydro N-Tester) und den Werten der Image-Analyse gibt. Innerhalb des RGB-Farbraums ist der Rot-Ton am stärksten mit dem Chlorophyllgehalt korreliert ($r = -0,83$). Eine ähnliche Studie von BLACKMER et al. (1996) wo Luftbildaufnahmen von Maisfeldern gemacht wurden, kam ebenfalls zu dem Ergebnis, dass der Rot-Ton des RGB-Farbraums am besten geeignet ist um die Stickstoffversorgung bzw. indirekt den Chlorophyllgehalt zu beschreiben.

Ein noch größerer Zusammenhang der Chlorophyllgehaltswerte des Hydro N-Testers zeigt sich mit der Farbart (Hue) des HSB-Farbmodells.

7. Zusammenfassung

Die Sojabohne (*Glycine max*) ist der Familie der Leguminosen zuzuordnen. Das besondere an den Leguminosen ist die Fähigkeit Luftstickstoff zu fixieren, was eine Reihe an positiven Erscheinungen zur Folge hat. Verantwortlich für die Luftstickstoff-Fixierung ist eine Symbiose mit Gram-negativen Bakterien, den Rhizobien. Im Fall der Sojabohne handelt es sich meist um eine Symbiose mit *Bradyrhizobium japonicum*. Durch die Interaktion der Pflanze mit der für sie spezifischen Rhizobienart, entstehen an der Pflanzenwurzel Knöllchen, die als Lebensraum für die Bakterien dienen und in denen in weiterer Folge die N₂-Fixierung stattfindet. Durch Mutationen auf Seiten der Bakterien und der Pflanzen kann es zu Fehlbildungen der Knöllchen oder sogar zur Hemmung der Knöllchenbildung (Nodulierung) kommen. Anhand dieser Mutationen können verschiedene Themen rund um die N₂-Fixierung studiert werden.

Das Ziel der Arbeit war es herauszufinden welchen Einfluss die Nodulierung bzw. die fehlende Nodulierung auf verschiedene Blattmerkmale wie Chlorophyllgehalt, Blattfarbe und Blattgröße hat. Ein zweiter Faktor der Arbeit war die Evaluierung der dafür verwendeten Methoden (Hydro N-Tester und Image-Analyse).

Diese Diplomarbeit wurde am Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung der Universität für Bodenkultur in Wien durchgeführt. Als Grundlage für die Experimente dienten 100 verschiedene Genotypen, entstanden aus der Kreuzung eines nodulierenden Genotyps mit einem nicht-nodulierenden Genotyp. Zum Untersuchungszeitpunkt befanden sich die Genotypen bereits in der F₆-Generation. Durch die Aufspaltung standen daher für die Untersuchungen nodulierende, heterozygote und nicht-nodulierende Genotypen zur Verfügung.

Es wurden drei Experimente zu unterschiedlichen Untersuchungszeitpunkten durchgeführt. Das erste Experiment fand Mitte September statt und das zweite Anfang Oktober. Das dritte Experiment beschäftigte sich mit den Methoden.

Chlorophyllgehalt

Bei Experiment 1 (Mitte September) unterschieden sich die Genotypen signifikant im Chlorophyllgehalt. Die nodulierenden Genotypen wiesen wie erwartet den höchsten Mittelwert für den Chlorophyllgehalt auf. Danach folgten die heterozygoten Genotypen und die nicht-nodulierenden Genotypen wiesen den geringsten Mittelwert für den Chlorophyllgehalt auf.

Bei Experiment 2 (Anfang Oktober) konnten keine signifikanten Unterschiede im Chlorophyllgehalt festgestellt werden. Grund dafür waren vermutlich die niedrigen Temperaturen im Versuchsvorfeld bzw. das Entwicklungsstadium R5 (Beginn der Samenbildung).

Blattfarbe

Mit Hilfe der Image-Analyse konnten im Experiment 1 keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen bezüglich Blattfarbe festgestellt werden. Die Blattfarbebonitur (Grün) hingegen zeigte, dass die nodulierenden Genotypen dunklere Blätter aufwiesen.

Im Experiment 2 konnten signifikante Unterschiede bezüglich Blattfarbe zwischen den Genotypen festgestellt werden. Hoch signifikant unterschieden sich die Genotypen im Blau-Ton des RGB-Farbmodells.

Blattgröße

Die Genotypen zeigten keine signifikanten Unterschiede in der Blattgröße.

Methoden

Der Hydro N-Tester ist eine einfache rasche Methode um den indirekten Chlorophyllgehalt zu bestimmen. Im Experiment 3 wurden die Werte für den Chlorophyllgehalt den Image-Analyse Werten gegenübergestellt. Die Messwerte des Hydro N-Testers korrelierten mit den Messwerten der Image-Analyse. Am auffälligsten waren die negative Korrelation des Rot-Tons (RGB-Farbraum) $r = -0,83$ und die positive Korrelation des Hue (HSB-Farbraum) $r = 0,85$ mit den Chlorophyllgehaltswerten.

8. Abstract

The soybean is a legume. It's specific for legumes that they have the ability to fix dinitrogen, which causes a lot of positive effects. Responsible for this is a symbiosis with gram-negative bacteria, the so called *Rhizobia*. In the case of soybean it's mostly a symbiosis with *Bradyrhizobium japonicum*. Based on the interaction of the plant with its specific *Rhizobium*-species, nodules are generated on the roots, which provides a habitat for the bacteria and in further consequence the dinitrogen fixation will take place in these nodules. Due to mutations on the side of plants or on the side of bacteria, it is possible that malformations of nodules occurs. Further it is also possible that the nodule development is inhibited by such mutations. These mutations are often very helpful to study several problems related to dinitrogen fixation.

The aim of this work was to detect the effects of nodulation and nonnodulation on several leaf characteristics like chlorophyll content, leaf colour and leaf size. Another part of this work was to evaluate the methods which were used (Hydro N-Tester and Image analysis).

This diploma thesis was carried out at the Institute of Agronomy and Plant breeding at the University of Natural Resources and Applied Life Sciences in Vienna. The experiments were based on 100 genotypes which arose from a cross of a nodulated genotype and a nonnodulated genotype. To the time of analysis the genotypes have already been in the F₆-generation. The segregation caused that nodulated, heterozygous and nonnodulated genotypes were available for the investigations.

Three different experiments were conducted on different times. The first experiment was conducted in mid-September and the second was conducted in the beginning of October. The third experiment was concerned with the methods.

Following results were obtained:

Chlorophyll-content

In experiment 1 (mid-September) the genotypes differed significantly regarding to the chlorophyll content. The nodulated genotypes as expected showed the highest mean for the chlorophyll content. Afterwards the heterozygous genotypes followed and the nonnodulated genotypes showed the lowest mean.

In experiment 2 (early in October) there were no significant differences detected in the chlorophyll content between the genotypes. Probably a reason was the low temperature to the time of investigations. Another reason could be the stage of development R5 (begin of seed filling).

Leaf colour

With the aid of Image-Analysis there were no significant differences detected in leaf colour in experiment 1 between the genotypes. A leaf colour rating on the other hand showed that the leaves of the nodulated genotypes were darker in their colour than the nonnodulated.

In experiment 2 significant differences regarding to leaf colour between the genotypes were detected. The leaf colour was measured with Image analysis and a L*a*b colour-analyzer.

The genotypes differed highly significant in their blue-tone (RGB-colour-model).

Leaf size

There were no significant differences between the genotypes detected.

Methods

The Hydro N-Tester is a simple, quick and nondestructive method to measure the chlorophyll content indirectly. In experiment 3 the data for the chlorophyll content and the Image-Analysis data were compared. The measured data from the Hydro N-Tester correlated with the Image-analysis data. The best correlations were the negative correlation from the red-tone RGB ($r = -0,83$) and the positive correlation from Hue HSB ($r = 0,85$) with the chlorophyll content data.

9. Literaturverzeichnis

ADAMSEN F.J., T.A. COFFELT, J.M. NELSON, E.M. BARNES, R.C. RICE (2000): Method for Using Images from a Color Digital Camera to Estimate Flower Number. Crop Science 40: 709-712

BLACKMER T.M., J.S. SCHEPERS, G.E. VARVEL, G.E. MEYER (1996): Analysis of Aerial Photography for Nitrogen Stress within Corn Fields. Agronomy Journal 88: 729-733

CAMPBELL N.A. und J.B. REECE (2003): Biologie, 6. Auflage, Deutsche Übersetzung, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg · Berlin, Seite 929-932

DE DORLODOT S., P. BERTIN, P. BARET und X. DRAYE (2005): Scaling up quantitative phenotyping of root system architecture using a combination of aeroponics and image analysis. Aspects of Applied Biology 73: 41-54

FAOSTAT (2008): FAO Statistical Database, ProdSTAT module. FAO, Rome, <http://faostat.fao.org> (accessed: 2. April 2008)

GUFFY R.D., B.L. VASILAS und J.D. HESKETH (1992): Nitrogen partitioning and net photosynthesis in soybean genotypes differing in seed filling duration and N source. Biotronics 21: 1-10

GWATTA E.T., D.S. WOFFORD, P.L. PFAHLER (2003): Pollen morphology and in vitro germination characteristics of nodulating and nonnodulating soybean (*Glycine max* L.) genotypes. Theoretical and Applied Genetics 106: 837-839

HATEM I. und J. TAN (2003): Image Analysis, In: Encyclopedia of Agricultural, Food, and Biological Engineering, Marcel Dekker, New York: 517-523

HIRSCH A.M. (1992): Developmental biology of legume nodulation. New Phytologist 122: 211-237

KARCHER D.E. und M.D. RICHARDSON (2003): Quantifying Turfgrass Color Using Digital Image Analysis. Crop Science 43: 943-951

KARCHER D.E. und M.D. RICHARDSON (2005): Batch Analysis of Digital Images to Evaluate Turfgrass Characteristics. Crop Science 45: 1536-1539

LEFFEL R.C. (1992): Registration of high-protein soybean germplasm lines BARC-6, BARC-7. Crop Science 32: 502

MARTINEZ-ROMERO E. (1994): Recent developments in *Rhizobium* taxonomy. Plant and Soil 161: 11-20

POSTGATE J. (1998): Nitrogen Fixation Third Edition, Verlag Cambridge University Press, Cambridge, UK

PRACHT J.E., C.D. NICKELL, J.E. HARPER (1993): Genes Controlling Nodulation in Soybean: Rj5 and Rj6. Crop Science 33: 711-713

PRACHT J.E., .D. NICKELL, J.E. HARPER, D.G. BULLOCK (1994): Agronomic Evaluation of Non-Nodulating and Hypernodulating Mutants of Soybean. Crop Science 34: 738-740

PUM D. (2006): Digitale Bildverarbeitung in der Lebensmittel- und Biotechnologie. Skriptum zur Vorlesung, Vers. 3.01, Universität für Bodenkultur Wien, Wien.

QUIAN D., F.L. ALLEN, G. STACEY, P.M. GRESSHOFF (1996): Plant Genetic Study of Restricted Nodulation in Soybean. Crop Science 36: 243-249

RASOOLY A. und T.G. ISLEIB (1993): Epistasis of rj1 Nonnodulation of Soybean to Nodulation by *Sinorhizobium fredii*. Crop Science 33: 329-331

RICHARDSON M.D., D.E. KARCHER und L.C. PURCELL (2001): Quantifying Turfgrass Cover Using Digital Image Analysis. Crop Science 41: 1884-1888

SCHIEDER A. (2004): Erosionsmindernde Kartoffelproduktion unter besonderer Berücksichtigung phytopathologischer Aspekte. Dissertation am Wissenschaftszentrum Weihenstephan, TU München

SOLDATI A. (1999): Die Sojabohne, In: (Hrsg.) Keller Ernst, Hanus Herbert, Heyland Klaus-Ulrich: Handbuch des Pflanzenbaues 3 / Knollen- und Wurzelfrüchte, Körner- und Futterleguminosen; Band 3; Stuttgart (Hohenheim): Ulmer, Seite 660-685.

SPSS (1999): Sigma Scan Pro 5.0 User`s Guide, SPSS Inc. Chicago IL, USA

TAUBERT E. (2001): Untersuchung der Zusammenhänge zwischen externen Belastungsfaktoren und der Fleischqualität von Puten. Dissertation an der Martin-Luther-Universität, Halle/Saale

UDDLING J., J. GELANG-ALFREDSSON, K. PIKKI, PLEIJEL H. (2007): Evaluating the relationship between leaf chlorophyll concentration and SPAD-502 chlorophyll meter readings. Photosynthesis Research 91: 37-46

VOLDENG H.D. und G. SAINDON (1991): Registration of four pairs of “Maple Presto” derived soybean genetic stocks. Crop Science 31: 1398-1399

WERNER D. (1999): Biologische Stickstoff-Fixierung (BNF), In: (Hrsg.) Keller Ernst, Hanus Herbert, Heyland Klaus-Ulrich: Handbuch des Pflanzenbaues 3 / Knollen- und Wurzelfrüchte, Körner- und Futterleguminosen; Band 3; Stuttgart (Hohenheim): Ulmer, Seite 554-562.

WIER A.T. und D.J. BOETHEL (1994): Feeding Activity, Growth, and Survival of Soybean Looper on Low-Nitrogen Nonnodulating Soybean. Agronomy Journal 86: 1088-1091

WILLIAMS L.F. und LYNCH D.L. (1954): Inheritance of a Non-Nodulating Character in the Soybean. *Agronomy Journal* 46: 28-29

ZHANG F., C.C. TREVOR, B. PAN, D.L. SMITH (1996): Inhibition of the Expression of *Bradyrhizobium japonicum* Nod Genes at low Temperatures. *Soil Biology and Biochemistry* 28: 1579-1583

ZHANG F., M. DIJAK, D.L. SMITH, J. LIN, K. WALSH, H. VOLDENG, F. MACDOWELL, D.B. LAYZELL (1997): Nitrogen fixation and nitrate metabolism for growth of six diverse soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] genotypes under low temperature stress. *Environmental and Experimental Botany* 38: 49-60