

# **Die Stickstoffversorgung bei nodulierenden und nicht-nodulierenden Sojabohnen**

**Eine Phänotypisierung des Chlorophyll- und Proteingehalts**

**Masterarbeit**

Eingereicht von  
**Hildrun WALTER, Bakk. rer. nat.**

am Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung am Department für angewandte  
Pflanzenwissenschaften und Pflanzenbiotechnologie an der Universität für Bodenkultur  
Wien

Betreuer  
a.o. Univ. Prof. DI Dr. Johann Vollmann

Juni 2009

## Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Prof. DI Dr. Johann Vollmann für die engagierte Betreuung, die hilfreichen Tipps und die Überlassung des spannenden Themas.

Außerdem danke ich besonders Herrn Roman Tumpold für seine tatkräftige Hilfe.

# Inhaltsverzeichnis

Abstract .....	4
Einleitung.....	5
Ziel der Studie .....	6
Stand der Forschung .....	6
Der Stickstoffhaushalt der Pflanze.....	6
Etablierung der Symbiose.....	8
Die Stickstofffixierung .....	10
Nicht-nodulierende Sojabohnen .....	11
Chlorophyllmessung SPAD-502 .....	11
Bildanalyse .....	14
Nahinfrarotspektrometer .....	17
Material und Methoden.....	18
Saatgut und Anbau .....	18
Chlorophyllmessung .....	18
Bildanalyse .....	18
Ertragsmerkmale .....	19
Sameninhaltsstoffe .....	19
Statistische Auswertung .....	20
Ergebnisse .....	20
Chlorophyllgehalt .....	20
Reifezeit.....	23
Ertragsmerkmale .....	24
Sameninhaltsstoffe .....	25
Statistik .....	27
Diskussion .....	29
Chlorophyllgehalt .....	29
Reifezeit.....	31
Ertragsmerkmale .....	32
Sameninhaltsstoffe .....	32
Schlussfolgerung – Ausblick .....	34
Zusammenfassung.....	35
Bildverzeichnis .....	36
Literaturverzeichnis .....	37

## Abstract

Soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] has the ability to form root nodules in a symbiosis with bacteria from which it can gain a better nitrogen supply. The aim of this study was to phenotype nodulating and non-nodulating, near isogenic soybean lines with regard to leaf chlorophyll content, time to maturity, pod number, 1000 seed weight, seed protein and oil content. Further the suitability of image analysis for measuring chlorophyll content was tested. Nodulating lines had a significantly higher leaf chlorophyll content, higher pod number and 1000 seed weight, a lower seed oil content but a higher protein content as compared to non-nodulating lines. Time to maturity was influenced both by the genetic background and the type of nodulation. The image analysis was found to be a reliable method to measure leaf chlorophyll content. SPAD-values and seed protein content are significantly dependent on each other, so that known leaf chlorophyll content may allow an economically interesting prediction of seed protein content.

## Einleitung

Soja [*Glycine max* (L.) Merrill] ist eine der wichtigsten Kulturpflanzen weltweit, da die Sojabohne einerseits einen hohen Ölgehalt aufweist, andererseits für ihr ernährungsphysiologisch wertvolles Protein geschätzt wird. Je Kilogramm Sojabohne (Trockengewicht) können ca. 200 g Öl und 400 g Protein gewonnen werden, sodass Soja allein 60% des weltweiten pflanzlichen Proteinverbrauchs deckt (Vollmann et al., 2000, p. 1300). Das Öl wird sowohl als Speise- als auch als Industrieöl, das Protein als Futter- und Speisemittel genutzt. Die Gesamtanbaufläche im Jahr 2007 lag bei 94.899.216 ha, in Europa bei 1.982.193 ha und in Österreich bei 20.183 ha. Ein Großteil des Ertrages von 261.144.262 t im Jahre 2007 wurde für die Futtermittelproduktion genutzt, nur ein kleiner Teil wurde als Nahrungsmittel und für technische Verwendungszwecke weiterverarbeitet (FAO, 2009).

In der Gattung *Glycine* gibt es die Subgattungen *Glycine*, die Ausdauernden, und *Soja* (Moench), die Einjährigen. *Glycine max* (L.) Merrill gehört zu dem Subgenus *Soja* und ist eine domestizierte Pflanze, die Kultursoja. Sie entstand erst durch die Züchtung des Menschen und zeichnet sich durch einen aufrechten, wenig verzweigten, buschigen Wuchs aus. Die dreiteiligen Blätter sind gefiedert, wobei die einzelnen Fiederblättchen eine breit-ovale bis elliptisch-lanzettliche Blattform aufweisen. Die achselständigen Blüten, oft in reduzierten Trauben, können weiß, lila oder rosafarben sein, die Hülsen sind gerade bis leicht abgerundet mit ein bis drei meist gelben Samen je Hülse mit einem Tausendkorngewicht von ca. 100 bis 200g (Hymowitz, 2004, p. 97).

Sojabohnen, sowie einige andere Leguminosen, sind dazu befähigt, mit bestimmten Bakterienstämmen eine Symbiose einzugehen. Bei der Sojabohne handelt es sich um Stämme der Gattungen *Rhizobium* und *Bradyrhizobium*. Die Symbiose besteht darin, dass ein eigenes Symbiosom entwickelt wird, das Knöllchen, wo die Bakterioide Luftstickstoff (N<sub>2</sub>) fixieren und der Pflanze zur Verfügung stellen, die Pflanze im Gegenzug den Bakteroiden eine optimale Umwelt mit niedrigem Sauerstoffpartialdruck und ausreichender Kohlenstoffversorgung bietet.

Neben nodulierenden gibt es auch nicht-nodulierende Sojabohnen. Diese sind wirtschaftlich kaum von Bedeutung, dienen aber in der Wissenschaft als Gegenstück zu der nodulierenden Modellpflanze, um mehr über die Symbiose, ihre Funktionsweise und vor allem ihre Auswirkungen zu erforschen (Burton et al., 2006, p. 2710).

## Ziel der Studie

Ziel dieser Studie ist es, nodulierende und nicht-nodulierende Sojabohnen zu phänotypisieren, um Unterschiede festzustellen und diese für weitere Anwendungsbereiche wie z.B. die Pflanzenzüchtung zu charakterisieren. Dazu werden nahezu isogene Sojabohnenlinien, welche einerseits nodulierende und andererseits nicht-nodulierende Linien sind, auf Chlorophyllgehalt der Blätter, Reifezeit, Hülsenzahl und Tausendkorngewicht, sowie auf Öl- und Proteingehalt der Samen hin untersucht und verglichen.

Weiters soll die Eignung der Methode der Bildanalyse zur Messung des Chlorophyllgehalts im Vergleich zur Chlorophyllgehaltsmessung mittels SPAD-Meter untersucht werden. Im Rahmen dieser Untersuchungen soll auch der Zusammenhang zwischen Chlorophyllgehalt der Blätter und Stickstoffgehalt der Samen erarbeitet werden.

## Stand der Forschung

In diesem Kapitel soll die Bedeutung des Stickstoffs für die Pflanze, die Symbiose zwischen der Sojabohne und den  $N_2$ -fixierenden Bakterien, die Stickstofffixierung selbst und das Vorkommen von nicht-nodulierenden Sojabohnen erläutert werden. Anschließend wird das aktuelle Wissen über das Chlorophyllmessgerät SPAD-502 (Konica Minolta Sensing, Inc., 2003), über die Bildanalyse und das Nahinfrarotspektrometer (NIRS) zusammengefasst.

## Der Stickstoffhaushalt der Pflanze

Stickstoff wird in der Pflanze zum Aufbau von Aminosäuren und Proteinen, basischen Nucleinsäurebausteinen und Synthesepigmenten (Chlorophylle, Phycobiliproteine) benötigt. Der Stickstoffbedarf der Pflanze ist demnach sehr hoch, viele Böden sind jedoch verhältnismäßig stickstoffarm. So ist oft Stickstoff der für das Wachstum und die Entwicklung begrenzende Faktor. Pflanzen nehmen Stickstoff vorwiegend in Form des  $NO_3^-$ -Ions, selten als  $NH_4^+$ , aus dem Boden auf und dies ist oft die einzige Stickstoffquelle höherer Pflanzen.

In einer grünen Pflanze befinden sich etwa die Hälfte des Stickstoffs der Gesamtpflanze und etwa 70% des Blattstickstoffs in den Chloroplasten der Pflanze bzw. der Blätter (Strasburger et al., 2002, p. 242).

Einige Bakterien und Cyanobakterien können elementaren Stickstoff, der im Bodenwasser gelöst ist, fixieren. Sie können frei lebend sein oder mit höheren Pflanzen vergesellschaftet, wie z.B. die Wurzelknöllchenbakterien mit Hülsenfrüchtlern (Nultsch, 2001, pp. 375-376).

Es gibt gram-negative Bodenbakterien in der Familie der *Rhizobiaceae*, die die einzigartige Fähigkeit besitzen, Wurzeln von Leguminosen zu befallen und eine stickstofffixierende Symbiose zu entwickeln. Diese Symbiose ist in der Landwirtschaft von großer Bedeutung, da aus der Symbiose mit wichtigen Kulturpflanzen, wie z.B. der Sojabohne, eine deutliche Verminderung der benötigten künstlichen Stickstoffdüngungsmenge hervorgeht (Gwata et al., 2004, p. 154). Die Etablierung der Symbiose ist ein komplexer Vorgang zwischen Wirt und Symbiont und resultiert in der Bildung eines neuen Organs, dem Knöllchen (Abb. 1), das das Bakterium als intrazellulärer Symbiont besiedelt (Stacey et al., 2006, p. 110).



Abb. 1: Knöllchen an einer nodulierenden Sojabohnenwurzel (Vollmann)

## Etablierung der Symbiose

Bei der Etablierung der Symbiose scheiden die Pflanzen Isoflavone aus, die die Bodenbakterien anlocken.

„Legume-rhizobial nodulation begins with signal exchange between the symbiotic partners. This is initiated by flavonoid and isoflavonoid compounds exuded through the plant roots. The rhizobial symbionts recognize specific flavonoid signals produced by compatible host legumes and respond by producing a novel, lipo-chitooligosaccharide signal (Nod signal)“ (Subramanian et al., 2007, p. 282).

Die Bodenbakterien bewegen sich durch Chemotaxis zur Wurzel, heften sich an die Epidermiszellen der Wurzelhaare kurz nach der Calyptra, wodurch in der Pflanze die Nodulationsgene aktiviert werden. Es wird ein Enzym gebildet, das ein Lipochitin-Nodulations-Signal einleitet. Dadurch werden die frühen Nodulationsprozesse in den Wurzelhaaren in Gang gesetzt. Die Bakterien können nun über die Epidermis in das Wurzelhaar eindringen. An der Infektionsstelle wächst die Zellwand des Wurzelhaars nach innen und bildet einen Infektionsschlauch, in dem die Bakterien durch das Wurzelhaar bis zur Wurzelrinde vordringen. Noch bevor der Infektionsschlauch in die erste Wurzelrindenzelle eindringt, beginnt sich dort schon eine meristematische Zone zu bilden, es finden viele Zellteilungen statt. Auch in den äußeren Rindenschichten bilden sich neue Zellen. Die Infektionsschläuche dringen in die Rindenschicht ein, wobei auch hier die Zellwände und die Membran in die Zellen einwandern. Mehrere verzweigte Infektionsschläuche bilden so das infizierte Rindengewebe, die äußere Rindenschicht bildet die harte, nicht-infizierte Oberfläche des Knöllchens. An der Spitze der Infektionsschläuche werden in Tröpfchenform nach und nach Bakterien abgegeben, das heißt die Bakterien werden durch die Invaginationswände von der Wirtsmembran umgeben und sind so nie in direktem Kontakt mit dem Cytoplasma. Umgeben von der Wirtsmembran werden die Bakterien Bakterioide genannt. In jedem Tropfen befindet sich nur ein Bakteroid, dieses teilt sich aber in der Zelle bis die Wirtszelle komplett mit Bakteroiden gefüllt ist.

Während der nächsten 14 Tage reift das Knöllchen, wobei die Zellen wachsen, die Zellkerne der Wirtszellen allerdings immer kleiner werden und sich schließlich auflösen. Im Wirtsplasma bildet sich nun Leghämoglobin, das für eine sauerstoffarme Umgebung sorgt, da die Nitrogenase, das Stickstoff fixierende Enzym der Bakterioide, sauerstoffempfindlich ist. Sobald die Bakterioide aufgehört haben, sich zu teilen, beginnt



die Stickstofffixierung. Nachdem die Rhizodermis durch das wachsende Knöllchen gesprengt wurde, übernimmt das Rindengewebe die Abschlussfunktion und verkorkt. Zum Gasaustausch werden Lenticellen gebildet. Um den Stoffaustausch zwischen dem Wirt und dem Knöllchen zu ermöglichen, werden Parenchymzellen wieder teilungsfähig und bilden vorerst einen prokambialen Strang und später ein Leitungsgewebe und einen Kranz von Stärke speichernden Parenchymzellen. Durch Verzweigungen und neu gebildete Stränge entsteht rund um das Knöllchen ein Netz von Gefäßen, wodurch das weitere Wachstum des Knöllchens beschränkt wird. Vier Wochen nach der Infektion sind die Knöllchen fertig ausgebildet und sind schließlich 3 - 6 mm große Kugeln (Abb. 2).

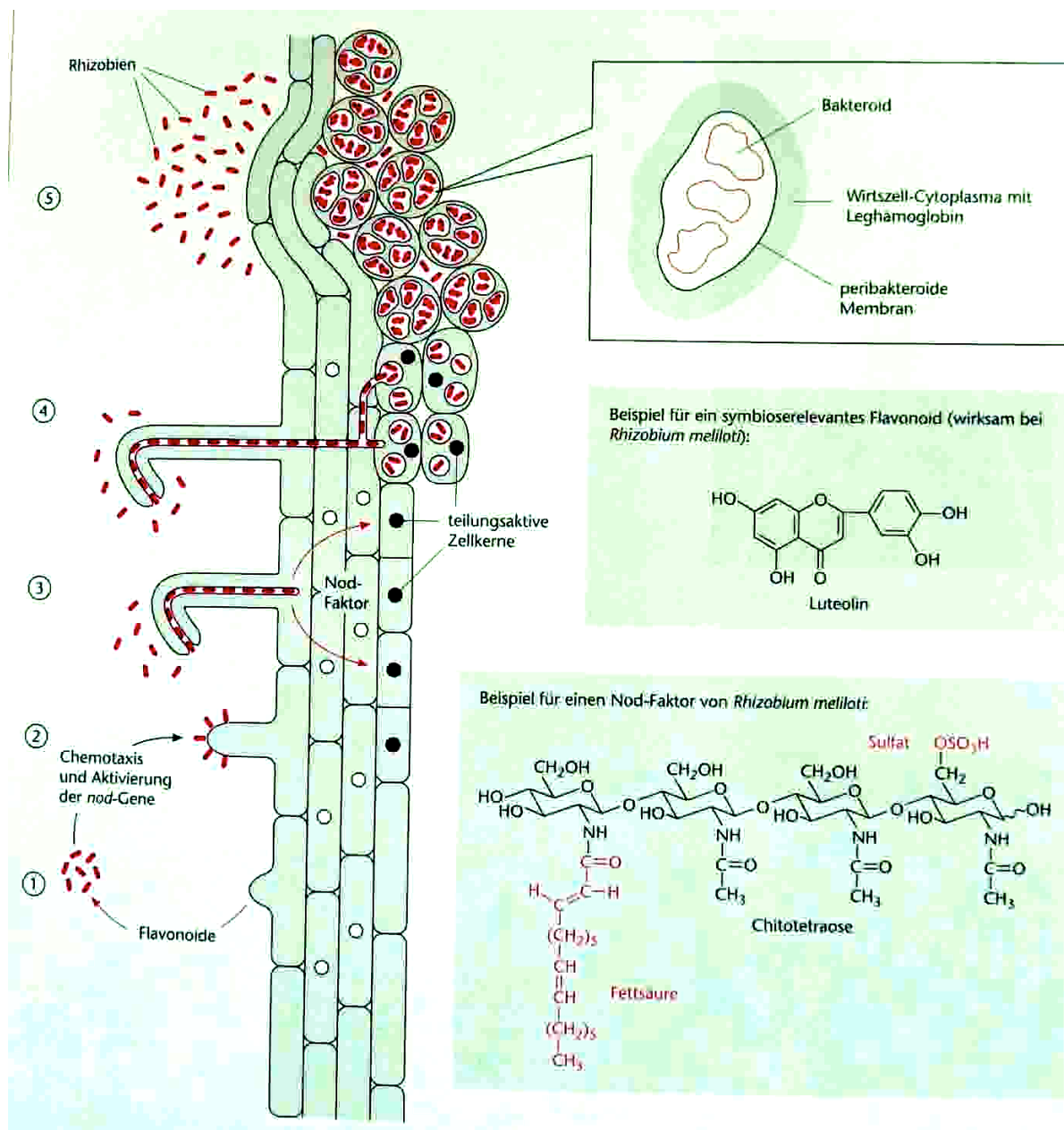


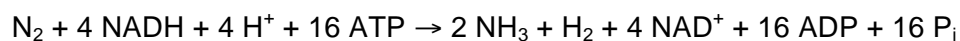
Abb. 2: Schematische Darstellung der Knöllchenentwicklung (Strasburger et al., 2002)

Nach sechs bis sieben Wochen gehen die Knöllchen in die Seneszenz, aber an den jüngeren Wurzelabschnitten findet fortwährend Neuinfektion statt. (Stacey et al., 2006; Lersten & Carlson, 2004).

## Die Stickstofffixierung

Nur einige wenige Eubakterien und Cyanobakterien besitzen das Enzym Nitrogenase, das es ermöglicht, Luftstickstoff ( $N_2$ ) zu Ammoniak ( $NH_3$ ) zu reduzieren, und spielen somit eine wichtige Rolle im Stickstoffkreislauf. Die symbiotische Stickstofffixierung ist leistungsfähiger als die der freilebenden  $N_2$ -Fixierer (15 - 20 kg  $N_2$  je Hektar und Jahr) und kommt bei der *Rhizobium*-Leguminosen-Symbiose auf 55 - 140 kg  $N_2$  je Hektar und Jahr. Das Knöllchen ist der Ort der Stickstofffixierung. Damit die Nitrogenase nicht zerstört wird, muss dieser Bereich sauerstoffarm werden. Dazu wird das Leghämoglobin gebildet, wobei das myoglobinähnliche Protein von der Pflanze, das Häm vermutlich aber von den Bakteroiden hergestellt wird. Das Innere des Knöllchens ist nun rot gefärbt. Das Leghämoglobin hat eine hohe Sauerstoffbindefähigkeit, was zu einem niedrigen Sauerstoff-Partialdruck zum Schutz von Nitrogenase und ihrer Gene führt.

Die Reaktion, bei der  $N_2$  in  $NH_3$  umgewandelt wird, ist sehr energieaufwendig und benötigt acht Elektronen, wobei sechs für die Reduktion von  $N_2$  und zwei für die Reduktion von  $2 H^+$  zu  $H_2$  benötigt werden.



Der fixierte Stickstoff wird größtenteils in Form von Ammonium-Ionen ( $NH_4^+$ ) über die Bakteroid- und die Peribakteroidmembran in die Pflanze transportiert. Noch im Gewebe der Wurzelknöllchen wird das Ammonium in Allantoin und Allantoinsäure umgewandelt, um es so innerhalb der ganzen Pflanze transportieren zu können. Der Transport vom und zum Knöllchen erfolgt über die Leitbündel, die bei der Knöllchenentwicklung mit angelegt wurden.

Die Pflanze liefert den Bakteroiden reduzierten Kohlenstoff in Form von Malat. Das Malat wird im Citrat-Zyklus oxidiert und so NADH und  $FADH_2$  gewonnen, was für die ATP-Bildung in der bakteriellen Atmungskette genutzt wird. Außerdem liefert ein Teil des NADH die Elektronen für den Nitrogenase-Komplex (Strasburger et al., 2002, pp. 494-500).

Wie aufwendig die N<sub>2</sub>-Fixierung für die Pflanze ist und was sie ihr bringt, ist wie folgt beschrieben: Für Wurzelknöllchen wird ein Verbrauch von 5 - 20 mg Kohlenhydrat pro mg reduziertem N angegeben. Die Fixierungsrate beträgt dabei 30 - 100 mg N pro Gramm Frischmasse der Knöllchen pro Tag, d.h. ein Knöllchen kann täglich etwa 3 - 10 mal seinen eigenen Stickstoffgehalt umsetzen (Strasburger et al., 2002, p. 500).

## Nicht-nodulierende Sojabohnen

Sojabohnen, die keine Knöllchen bilden können, haben eine Mutation, die schon Williams und Lynch 1954 beschrieben: „A mutation is described which does not develop nodules when inoculated with ordinary soybean bacteria, *Rhizobium japonicum*. Data from F1, backcross, F2, and F3 generations indicate that the lack of nodulation is due to a single recessive gene for which the symbol *no* is suggested“ (Williams & Lynch, 1954, p. 29).

Dieses rezessive Allel wurde *rij1* statt *no* benannt und verhindert bei homozygotem Auftreten eine Nodulierung durch *Bradyrhizobium japonicum* und *Bradyrhizobium elkanii* (Burton et al., 2006, p. 2709).

## Chlorophyllmessung SPAD-502

Die Chlorophyllmessung erfolgte mittels des tragbaren Chlorophyll-Messgeräts SPAD-502 (Konica Minolta Sensing, Inc., 2003), welches den relativen Chlorophyllgehalt durch die Absorption des Blattes von blauem (400 - 500nm Wellenlänge) und rotem (600 - 700nm Wellenlänge) Licht bestimmt (Abb. 3).



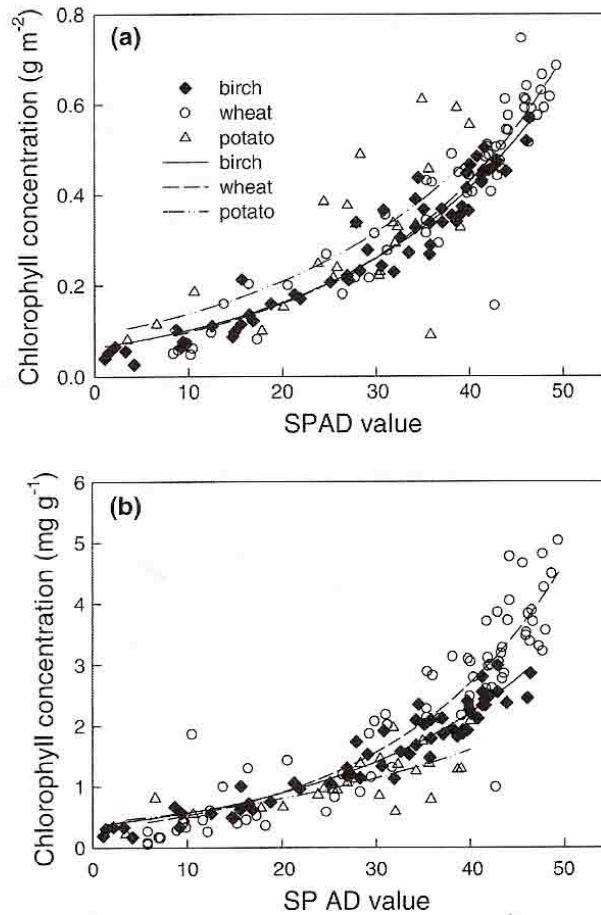
Abb. 3: Chlorophyll-Messgerät SPAD-502

Dies basiert auf den Absorptions- und Reflexionseigenschaften von Chlorophyll bei diesen Wellenlängen. Bei der Messung wird das Blatt in die Messkammer eingeklemmt und Licht der oben angeführten Wellenlängen durch das Blatt transmittiert. Durch Rezeptoren kann das transmittierte Licht quantifiziert werden. Die Transmission bei beiden Wellenlängenbereichen wird verglichen und das SPAD-Meter berechnet automatisch einen numerischen Wert, den sog. SPAD-Wert (Gwata et al., 2004, p. 155).

Ein klarer Vorteil dieser Messmethode ist, dass *in vivo* gemessen wird und sie nicht destruktiv ist und somit auch junge Stadien mit wenig Blättern gemessen werden oder häufige Messungen an kleinen Pflanzen vorgenommen werden können, ohne den Pflanzen zu schaden. Diese Methode ermöglicht auch eine Zeit- und Kostenersparnis gegenüber der konventionellen photometrischen Messung mit Blattextrakten der Pflanzen (Uddling et al., 2007, p. 38). Das SPAD-Meter wurde bereits an einer Reihe von Pflanzen, so auch an der Sojabohne, zur Messung des Chlorophyllgehalts verwendet (Fritschi & Ray, 2007, p. 92).

Ein Nachteil dieser Messmethode liegt darin, dass eine quantitative Interpretation des SPAD-Werte-Chlorophyllkonzentration-Verhältnisses schwierig ist, da im SPAD-502 Handbuch kein Algorithmus für die Erstellung der SPAD-Werte angegeben ist (Uddling et al., 2007, p. 42). Weiters ist es nachteilig, dass größere Felder nur mit sehr hohem Arbeitsaufwand gemessen werden können, da das Gerät viele manuelle Einzelmessungen erfordert.

Zwischen den SPAD-Werten und Chlorophyllgehalten der Blätter wurden hochsignifikante Korrelationen gefunden (Fritschi & Ray, 2007, p. 94). Uddling zeigte jedoch, dass der Chlorophyllgehalt bei Kartoffel, Weizen und Birke mit dem SPAD-Wert nicht linear korreliert ist, sondern die Korrelation eine ansteigende Kurve ergibt (Abb. 4).



**Fig. 1** Leaf chlorophyll concentration, expressed per unit (a) leaf area or (b) leaf fresh weight, in relation to the SPAD-502 values for birch, wheat (Dragon data set from 1997), and potato. The equations of the exponential regression lines and their coefficients of determination ( $r^2$ -values) are given in Table 1. The SPAD-502 values for wheat was estimated from Hydro N-tester readings using the calibration curve given in Fig. 3

Abb. 4: Zusammenhang zwischen Chlorophyllkonzentration und SPAD-Wert  
(Uddling et al., 2007)

Dies wird dadurch erklärt, dass eine ungleichförmige Chlorophyllverteilung über die Blattfläche und vielseitige Zerstreuung eine Abweichung von einem linearen Zusammenhang in sehr hohen und niedrigen SPAD-Werte-Bereichen verursachen (Uddling et al., 2007, p. 37). In einer weiteren Publikation über Sojabohnen wurde an verschiedenen Genotypen geforscht, wobei eine lineare Korrelation für einen Genotyp mit hohen Chlorophyllschwankungen, allerdings eine Kurve für Genotypen mit geringen Schwankungen ermittelt wurde. (Fritschi & Ray, 2007, pp. 94-95).

## Bildanalyse

Die Bildanalyse ist ein Verfahren, womit Fotos bearbeitet werden, um eine gewisse Aufgabe leichter zu erfüllen. Die Anwendung von Bildanalyse ist vor allem in der Naturwissenschaft sehr verbreitet und wird für unterschiedlichste Zwecke genutzt, wobei meistens aber das menschliche Sehen technisch nachgeahmt werden soll. So wird die Bildanalyse z.B. im Bereich der Nahrungsmittelqualitätsprüfung (Reifestadium von Früchten), in der Cytologie (Wachstum von Zellkulturen) und in vielen anderen Bereichen eingesetzt (Hatem & Tan, 2003, p. 517). Schon 1999 entwickelten Ewing und Horton ein Bildanalyseprogramm für Farbfotos, um die Quantifizierung von Objekten in landwirtschaftlichen Versuchen zu erleichtern. Sie dachten daran, das Programm so auszulegen, dass ein unabhängiger Parameter, wie z.B. der N-Gehalt der Blätter, mit den Farbparametern korreliert werden kann. (Ewing & Horton, 1999, p. 148) Bei der Sojabohne wurde die Bildanalyse beispielsweise schon für die Erkennung und Quantifizierung von dunklen Samenschalenverfärbungen angewandt (Morrison et al., 1998, p. 471).

Generell entsteht ein Bild durch Erfassen von elektromagnetischer Strahlung, die von Objekten zurückgeworfen wird. Diese Strahlung wird in ein elektrisches Signal umgewandelt, z.B. kann dieses Signal die Anzahl an erfassten Photonen widerspiegeln. Am Computer erfolgt dann die Digitalisierung, d.h. die Einteilung des Fotos in Rechtecke, die Pixel. Außerdem wird bei der Digitalisierung der Helligkeitsgrad bzw. die Grau- oder Farbwerte in ganzen Zahlen gespeichert (Quantisierung). Die Wirklichkeit wird umso genauer wiedergespiegelt, je mehr Pixel in der räumlichen Auflösung sind und je höher die Helligkeitsauflösung ist. Bei einem multispektralen Bild werden mehrere einzelne Graubilder im gleichen Moment aufgenommen. Für ein buntes Foto werden so beispielsweise drei verschiedene Sensoren verwendet, die auf unterschiedliche Wellenlängen reagieren. So werden drei Graubilder von verschiedenen Spektren genommen: von rotem, grünem und blauem Licht. Durch die aufgenommene Information und die Überlagerung der Bilder kann ein buntes Foto errechnet werden. Das beschriebene Verfahren weist also starke Analogien mit dem menschlichen Sehen auf (Hatem & Tan, 2003, p. 517; Pum, 2007, p. 2).

Farbige Fotos können mittels verschiedener Farbmodelle dargestellt werden, wobei das RGB-Modell (Rot, Grün, Blau) dem menschlichen Sehen sehr nahe kommt. Durch die drei verschiedenen Farbrezeptoren auf der Netzhaut können die unterschiedlichen Strahlungsintensitäten in den für uns sichtbaren Wellenlängen von unserem Gehirn so

interpretiert werden, dass in unserer Wahrnehmung Farbe entsteht. Die Farbe ist dabei nicht unbedingt ein physikalisches Phänomen. Im RGB-Farbraum wird die Lichtintensität im roten, grünen und blauen Spektrum für jedes Pixel berechnet. Es ist eines der meist benutzten Farbsysteme. Das RGB-Modell lässt sich aber auch in das HSB-Modell (hue, saturation, brightness) umwandeln. *Hue*, die Farbe, wird in einer Kreisskala mittels einer Gradzahl beschrieben. *Saturation*, die Sättigung, gibt die Reinheit der Farbe in einer Prozentzahl an. *Brightness*, die Helligkeit, gibt die Helligkeit bzw. Dunkelheit der Farbe in einer Prozentzahl an, wobei 0% schwarz und 100% weiß wären. Der Vorteil dieses Farbraums im Vergleich zum RGB-Farbraum ist, dass die Farbe in einzelne Aspekte wie Sättigung oder Intensität aufgeteilt werden kann, um diese so unabhängig voneinander zu beurteilen. (Pum, 2007, pp. 9-10; Ewing & Horton, 1999, pp. 148-149; León et al., 2006, p. 1085; Karcher & Richardson, 2003, p. 944). In der Abb. 5 ist ihr graphischer Zusammenhang dargestellt.

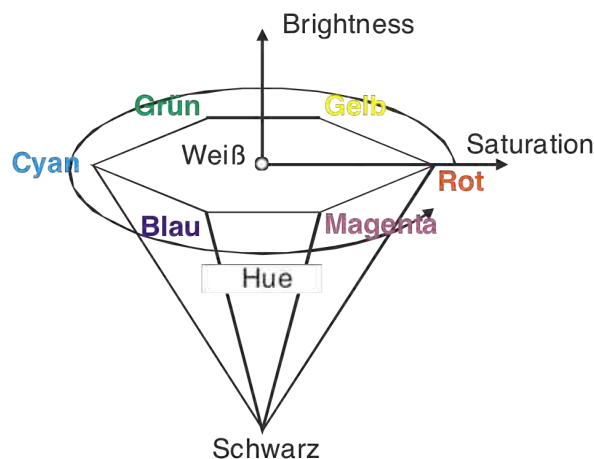


Abb. 5: Grafik über den Zusammenhang von RGB- und HSB-Modell (Pum, 2007)

Die Bildanalyse bietet nicht nur die Möglichkeit der Verbesserung von Fotos mittels geometrischer Gleichungen und Pixel-basierter Verfahren, sondern auch die Auswertung von Fotos für bestimmte Fragestellungen wird ermöglicht. So muss z.B. für viele Fragestellungen das Objekt vom Hintergrund unterschieden werden können. Das wird mittels der Bildsegmentierung ermöglicht, die durch unterschiedliche Techniken erreicht werden kann.

In der vorliegenden Untersuchung wird jenes Verfahren verwendet, wobei jedes einzelne Pixel des Bilds einem Bereich zugeordnet wird. Das dazu angewandte Grenzwertverfahren eignet sich besonders für Objekte, die sich von einem dazu kontrastierendem Hintergrund abheben. Es werden ein gewisser Helligkeitsgrad (brightness, gray-level), eine Sättigung (saturation) oder ein Farbwert (hue) als

Grenzwert festgelegt, und für jedes Pixel wird die Zugehörigkeit zu der Gruppe oberhalb der Grenze oder darunter berechnet (Hatem & Tan, 2003, pp. 519-520). Es besteht die Möglichkeit der farbigen Überlagerung der Pixel, je nachdem, zu welcher Gruppe sie gehören. Dies ermöglicht ein schnelles Kontrollieren der korrekten Segmentierung.

Bei der sogenannten "feature extraction" oder Merkmalsextraktion bzw. Bildauswertung werden am Objekt abgesondert vom Hintergrund viele Messungen durch Berechnungen ermöglicht. Dabei gibt es kaum technische Standards, aber häufig werden am Objekt die Größe, die Form und die Beschaffenheit untersucht (Hatem & Tan, 2003, p. 521). Im vorliegenden Versuch wurden die Größe des Blattes und dessen Farbgegebenheiten mittels Merkmalsextraktion untersucht.

Die Vorteile der Bildanalyse liegen darin, dass es sich um eine schnelle Methode handelt, da in kurzer Zeit viele Fotos geschossen und mittels Computer ausgewertet werden können. Es ist möglich, Untersuchungen auf verschiedenen Ebenen durchzuführen: Pflanzenteile (Blätter, Früchte, Blüten etc.), Einzelpflanzen, Einzelreihen, Blöcke und Felder können fotografiert und ausgewertet werden. Die Bildanalyse ermöglicht ein objektives Beurteilungsverfahren im Gegensatz zur menschlichen Wahrnehmung, und die Ergebnisse sind reproduzierbar (Hatem & Tan, 2003, p. 517). Durch häufiges Betreten des Feldes und Berühren der Pflanzen für verschiedene Messungen können Schäden entstehen und so das Ergebnis beeinflussen. Durch die Bildanalyse wird es ermöglicht, Fotos als Basis zu nehmen, ohne das Feld zu betreten, und so die Pflanzen zu schonen. Die Bildanalyse ist somit schonender und schneller als viele herkömmliche Techniken (Adamsen et al., 2000, p. 704).

Vorteilhaft gegenüber einem Chlorophyllmessgerät oder Colorimetern ist, dass statt einer kleinen Fläche von ca. 2 cm<sup>2</sup> mit Fotos viel größere Flächen bzw. ganze Objekte ausgewertet werden können und so meist genauere Ergebnisse erzielt werden können (León et al., 2006, p. 1085). Außerdem wird durch Speicherung der Bilder ermöglicht, dass man über die gesamte Vegetationsperiode Bildmaterial sammeln und dann am Ende der Saison in arbeitsärmeren Wochen ohne Qualitätsverlust mittels Bildanalyse aufarbeiten kann (Karcher & Richardson, 2003, p. 951).

Ein Nachteil ist, dass diese Methode erst in wenigen Bereichen standardisiert ist und es somit bis jetzt noch wenig Methodik und Ergebnisse zum Vergleichen gibt.



Nachteilig an der Nutzung des RGB-Farbraums ist, dass dieser nicht absolut ist, sondern von externen Faktoren, wie z.B. der Sensibilität des Sensors und den Lichtverhältnissen, beeinflusst wird (León et al., 2006, p. 1085).

## Nahinfrarotspektrometer

Die Protein- und Ölgehaltsmessung wurde mit dem Nahinfrarotspektrometer (Bruker Matrix-I Transform NIRS – Bruker, Ettlingen, Deutschland) durchgeführt. Das NIRS ist für die Qualitätsuntersuchung von Sameninhaltsstoffen in Pflanzenzüchtungsprogrammen schon etabliert. Die Vorteile des NIRS im Vergleich zu den analytischen Standardmethoden liegen darin, dass die Methode schnell und kostengünstig ist und keine chemischen Stoffzusätze notwendig sind. Außerdem ermöglicht das NIRS die Messung mehrerer Merkmale gleichzeitig. Zuerst wird das Messgerät kalibriert, wobei unterschiedliche Strahlungsabsorptionen von sichtbarem und nah-infrarotem Licht (400 – 2500 nm) mit verschiedenen Probeneigenschaften bekannter Proben verbunden werden. Aus den Messungen werden Regressionsgleichungen (Abb. 6) errechnet, die eine zuverlässige Messung unbekannter Proben ermöglicht (Font et al., 2006, p. 308).

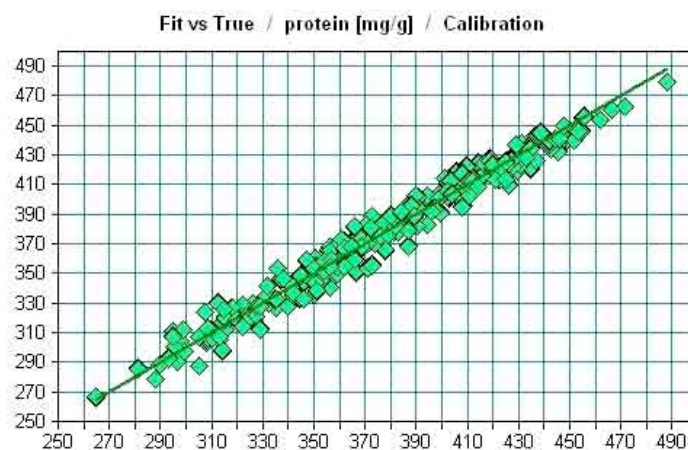


Abb. 6: Regressionsgleichung der Kalibration für Protein bei Sojabohnen (Vollmann)

Der Nachteil der NIRS-Messung liegt darin, dass das Gerät mindestens einmal je Saison kalibriert werden muss und dazu Proben mit bekannten Eigenschaften benötigt werden. Die Qualität der Eichgerade bestimmt die Genauigkeit der Messwerte.

# Material und Methoden

## Saatgut und Anbau

Das Samenmaterial stammt von einer Kreuzung aus dem Jahr 2001, wobei die nicht-nodulierende Linie OT89-13 der Sorte *Maple Presto* und die nodulierende Sorte BARC-6 miteinander gekreuzt wurden. Die Samen der F1-Pflanzen wurden geerntet und in Linien angebaut. In der dritten Filialgeneration wurden sechs Linien ausgewählt, die in der zweiten Filialgeneration für das Merkmal Nodulation heterozygot waren. Diese wurden bis in die siebte Filialgeneration weitergeführt, sodass 120 nahezu isogene Linien entstanden, die nur im Merkmal Nodulation aufspalten. Diese 120 Linien lassen sich in sechs Verwandtschaftsgruppen teilen, je nachdem, aus welcher F2-Linie sie entstanden. Eben diese siebte Filialgeneration wurde auf verschiedene Merkmale hin untersucht. In dieser Generation sind die meisten Linien auch für das Merkmal Nodulation homozygot. Die Samen wurden am 09.05.2008 auf einem Feld (11 x 20,5 m) an der Universität für Bodenkultur mit einem Reihenabstand von 35 cm angebaut. Es wurde keine Düngung oder Pestizidanwendung vorgenommen.

## Chlorophyllmessung

Für die Chlorophyllmessung wurde zuerst das Messgerät SPAD 502 kalibriert, indem die Messkammer leer zugedrückt wurde. Dann wurde bei 20 Pflanzen einer Linie das oberste voll entwickelte Blatt in das SPAD-Messgerät eingeklemmt, den SPAD-Messwert genommen und gespeichert. Später wurde für jede Linie über die 20 Einzelmessungen ein Durchschnittswert berechnet. Somit wurde der Einfluss von ungleichmäßigen Chlorophyllverteilungen minimiert (Uddling et al., 2007, p. 45). Es wurde darauf geachtet, die Hauptblattadern bei der Messung auszulassen, da diese kein Chlorophyll enthalten. Die dritte SPAD-Messung erfolgte allerdings an nur fünf Blättern je Linie, dieselben Blätter, die auch mittels der unten beschriebenen Bildanalyse untersucht wurden. Diese fünf Blätter wurden mehrmals an verschiedenen Stellen gemessen (insgesamt 20 Einzelmessungen) und ein Mittelwert gebildet.

## Bildanalyse

Für die Bildanalyse wurde je Linie bei fünf Pflanzen das oberste voll entwickelte Blatt geerntet. Die Fotokamera Sony DSC F707 (Sony Corp., Tokyo, Japan) und die

Beleuchtung wurden auf einem Stativ fixiert. Die Fotos wurden folglich aus der gleichen Entfernung und bei gleicher Beleuchtung mit einer Auflösung von 640x480 Pixel durchgeführt, womit ein späterer Vergleich möglich wurde. Es wurde ein roter Hintergrund gewählt, die Komplementärfarbe zu grün, da sich so bei der Bildanalyse das Blatt am besten vom Hintergrund abhebt und eine einwandfreie Bildsegmentierung möglich ist. Die Bildsegmentierung erfolgte mit dem Stapelverarbeitungsmakro *Sigma Scan Pro Macro*, das von Karcher und Richardson entwickelt wurde (Karcher & Richardson, 2005). Die Grenzwerte bei der Bildsegmentierung wurden für die Farbe (hue) bei 33 - 110 und für die Sättigung (saturation) bei 6 - 100 festgelegt. Die Blätter wurden durch diese Segmentierung erkannt und mit gelber Farbe überlagert. Nach der Segmentierung wurde für die weitere Bildanalyse die Software Sigma Scan Pro (Vers. 5, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) verwendet. Die Größe des Blattes wurde anhand der Pixelzahl des markierten Objekts gemessen. Die weitere Auswertung der Fotos erfolgte in zwei Farbräumen: im RGB- und im HSB-Farbraum.

Als Vergleich der Bildanalyse und der SPAD-Messung wurden dieselben Blätter auch mit dem SPAD-Meter gemessen.

## Ertragsmerkmale

Zu Vegetationsende wurde für jede Linie die Hülsenzahl je Pflanze (Mittelwert von drei ausgezählten Pflanzen) und die Reifezeit bestimmt. Zur Ernte wurden die Wurzeln ausgegraben und so die Nodulationsform visuell bestimmt. Nach der Ernte der Sojabohnen wurden die Hülsen zwei Wochen getrocknet, dann gedroschen und die Samen anschließend weiter über das Tausendkorngewicht (TKG) und den Protein- bzw. Ölgehalt untersucht. Das TKG wurde anhand des Abwiegens von 100 Samen geschätzt.

## Sameninhaltsstoffe

Zur Protein- und Ölgehaltsmessung wurden je Linie ca. 30 Samen mit der Mühle Cyclotec 1093 (Foss Tecator, Höganäs, Schweden) vermahlen, das Mehl in ein Messglas überführt und das Glas dann in den Probenhalter gestellt. Die erste Messung erfolgte, danach wurde das Glas um ca. 90° gedreht und eine zweite Messung durchgeführt, um den Fehler möglicher Unregelmäßigkeiten innerhalb der Probe zu minimieren. Es wurde darauf geachtet, vermischungsfrei zu arbeiten. Der Computer, an dem das Messgerät angeschlossen ist, hat die Absorptionsdaten aller Linien aufgezeichnet (Abb. 7) und den Protein- und Ölgehalt errechnet.

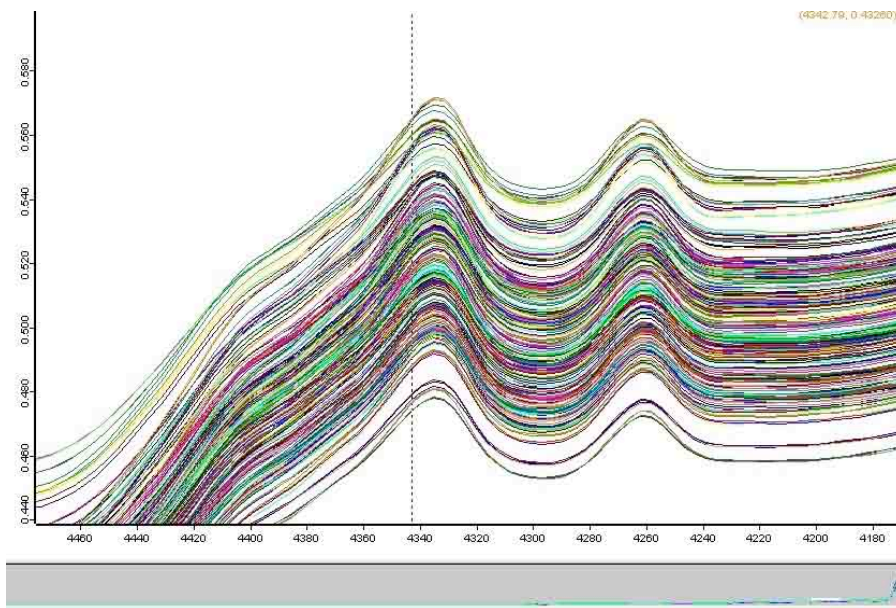


Abb. 7: Ausschnitt des Absorptionsdatendiagramms der 120 getesteten Linien

## Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Statistikprogramm SAS (SAS Institut, 1988). Wir haben als Faktoren die Nodulationsform, die sechs verschiedenen Linien und alle Genotypen getestet, wobei die abhängigen Variablen die Bonitur des Blattgrüns, die Entwicklung und die Reife, die Wuchshöhe, die SPAD-Meter-Messungen, die relative Blattgröße, rot, blau und grün sowie hue, saturation und brightness aus den Bildanalysen, die Hülsenzahl, das TKG und der Protein- und Ölgehalt sind.

## Ergebnisse

Es wurde der Chlorophyllgehalt, die Hülsenzahl je Pflanze, die Reifezeit, das TKG und der Protein- bzw. Ölgehalt gemessen.

## Chlorophyllgehalt

Der Chlorophyllgehalt wurde einerseits mit dem SPAD-Meter zu vier Messzeitpunkten untersucht, andererseits mittels Bildanalyse für einen Termin zusätzlich berechnet.

Die Chlorophylluntersuchung mittels SPAD-Meter zeigte zum ersten Messzeitpunkt (12. Juni 2008) noch keine deutlichen Unterschiede. Im Laufe der Vegetationsperiode zeigte sich allerdings, dass die Sojabohnenlinien mit Knöllchenbildung deutlich höhere SPAD-Werte aufwiesen als die ohne Knöllchen (Abb. 8). Außerdem ist in der Abbildung zu erkennen, dass bei den nodulierenden Sojabohnen der SPAD-Wert über den Messzeitraum ansteigt und nur zum letzten Messzeitpunkt hin leicht abfällt. Bei den nicht-nodulierenden Sojabohnen hingegen fällt der SPAD-Wert im Laufe des Messzeitraums kontinuierlich ab.

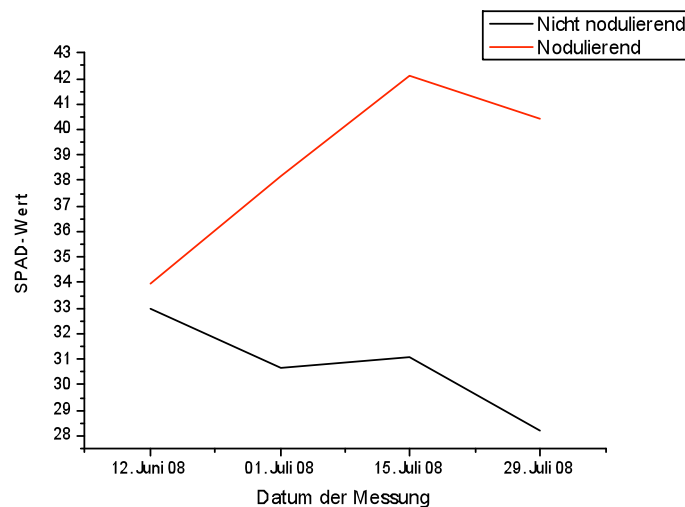


Abb. 8: SPAD-Werte über den Vegetationszeitraum von nodulierenden und nicht-nodulierenden Linien.

Die Fotos für die Bildanalyse zeigten im Farbton der Blätter deutliche Unterschiede (Abb. 9). Der Vergleich von den SPAD-Werten und den Ergebnissen der Bildanalyse vom dritten Messzeitpunkt, dem 15. Juli 2008, hat einen Zusammenhang zwischen dem Rotanteil des Bildes und dem dazugehörigen SPAD-Wert ergeben. Zusätzlich ist noch die Nodulationsform der einzelnen Linien angegeben. Daraus lässt sich erkennen, dass nodulierende Linien einen hohen SPAD-Wert aufweisen, aber einen geringen Rot-Wert in der Bildanalyse. Nicht-nodulierende Linien hingegen weisen einen geringen SPAD-Wert auf, aber einen hohen Rotanteil im Bild. (Abb. 10).

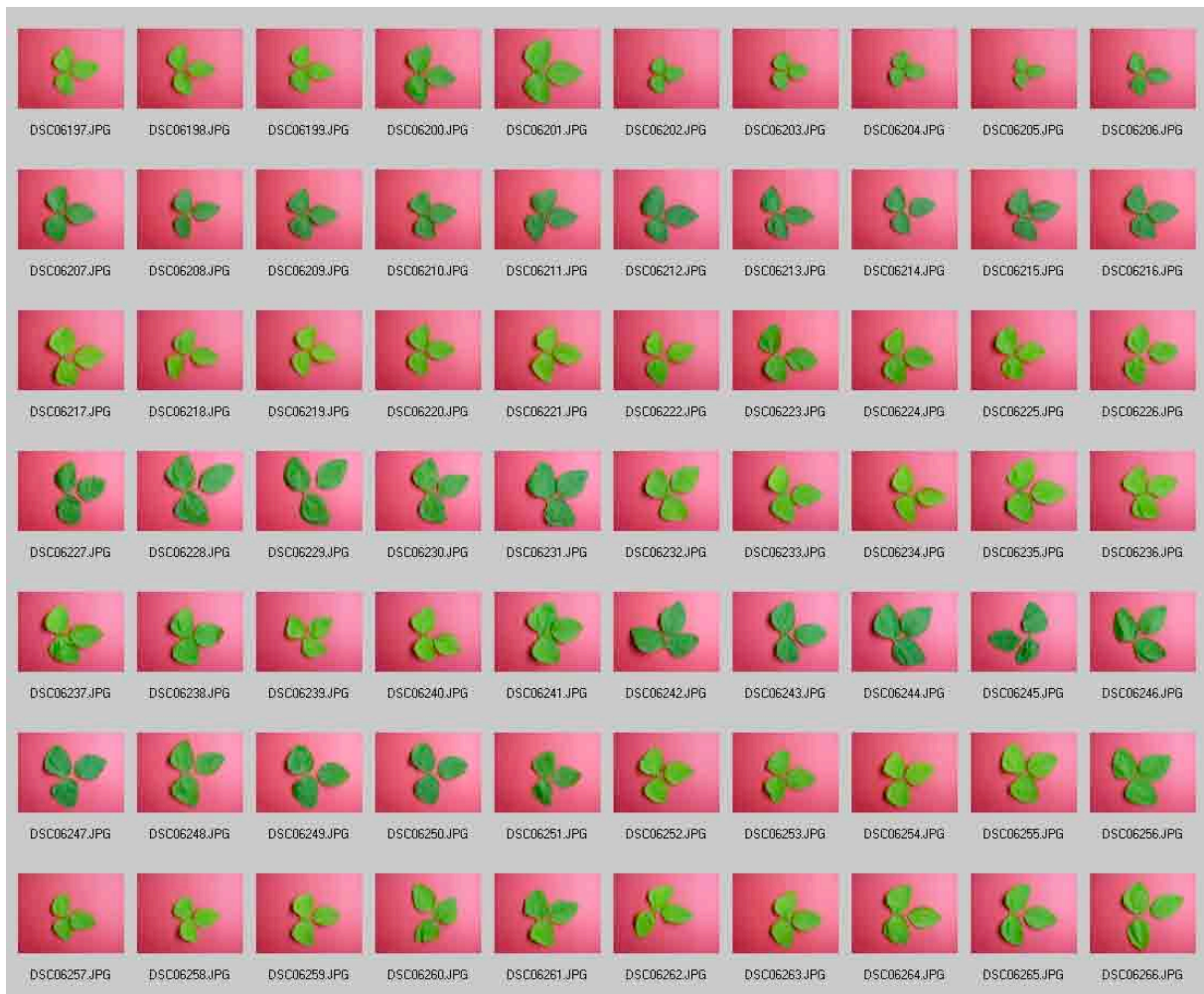


Abb. 9: Fotos für die Bildanalyse. Jeweils fünf Blätter gehören zu einer Linie. Es lassen sich auch visuell Unterschiede ausmachen.

Die statistische Auswertung der SPAD-Werte und der Daten aus der Bildanalyse wurde mittels einer Korrelationsrechnung durchgeführt. Der Pearsonsche Korrelationskoeffizient für den oben dargestellten Zusammenhang ist hoch signifikant ( $p < 0,0001$ ) und beträgt  $-0,91$  (Abb 10; siehe auch Tab. 1).

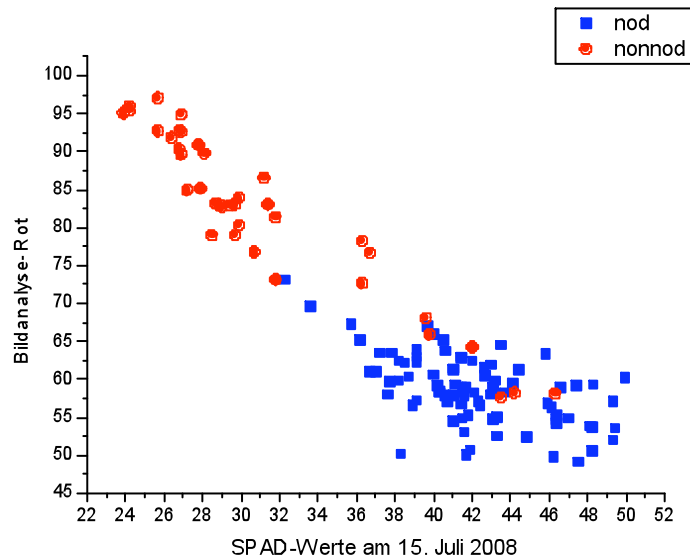


Abb. 10: Zusammenhang zwischen den SPAD-Werten und dem Rotwert der Bildanalyse bei nodulierenden und nicht-nodulierenden Linien.

## Reifezeit

Die Reifezeit wurde in Tagen nach dem 31. Juli 2008 aufgezeichnet, wobei sowohl statistisch bei der einfaktoriellen Varianzanalyse als auch mittels grafischer Auswertung kein Einfluss der Nodulationsform auf die Reifezeit erkennbar ist (Abb. 11).

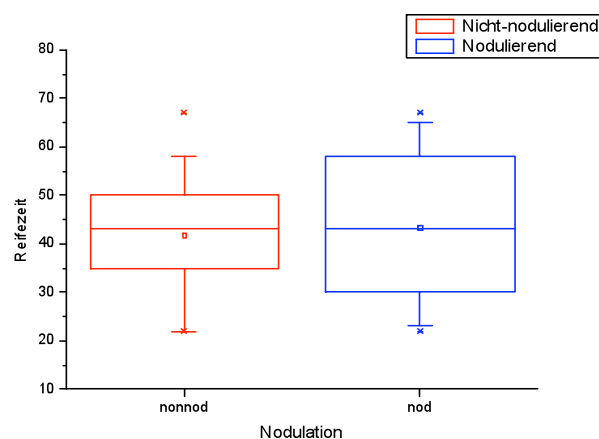


Abb. 11: Reifezeit in Tagen nach dem 31. Juli 2008.

Im Weiteren wurde eine zweifaktorielle Varianzanalyse durchgeführt, wobei die Variablen Nodulation und Genotypen berücksichtigt wurden. Die Genotypen stellen hier die sechs F2-Liniengruppen dar, in die die getesteten 120 Linien eingeteilt werden konnten. Die

zweifaktorielle Varianzanalyse über die Genotypen war für die Reifezeit hoch signifikant ( $p < 0,0001$ ), über die Nodulation hat sich eine Signifikanz von 0,0028 ergeben, wobei nicht-nodulierende Linien früher als die nodulierenden reif wurden..

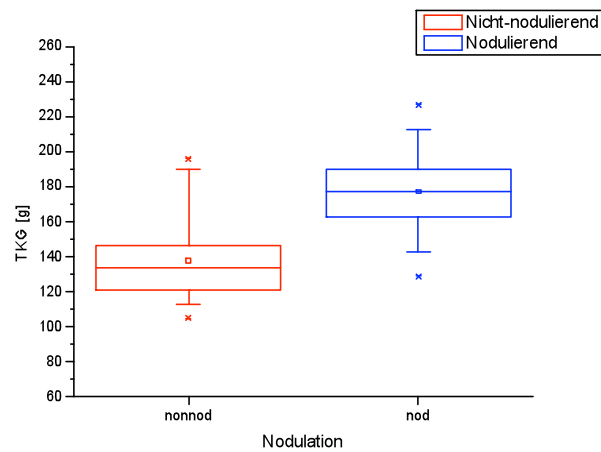
## Ertragsmerkmale

Als Ertragskomponenten wurden das TKG und die Hülsenzahl je Pflanze bestimmt. Bei beiden Faktoren weisen die nodulierenden Sojabohnen deutlich höhere Werte auf. Das TKG liegt bei den nodulierenden Linien im Durchschnitt bei 177g, bei den nicht-nodulierenden Linien bei 138g. Die Hülsenzahl beträgt bei nodulierenden Sojapflanzen im Durchschnitt 17,97 Hülsen je Pflanze, bei nicht-nodulierenden Sojapflanzen hingegen nur 11,32 (Abb. 12).

Auch die einfaktorielle Varianzanalyse zeigt einen hoch signifikanten Zusammenhang zwischen Nodulation und TKG ( $p < 0,0001$ ) und Nodulation und Hülsenzahl ( $p < 0,0001$ ).



**A**



**B**

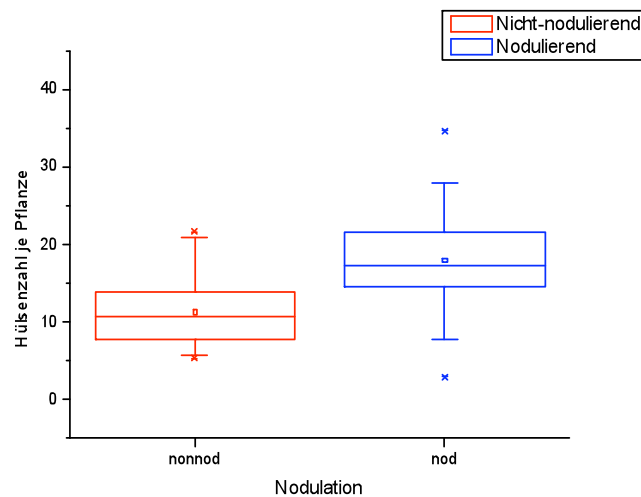


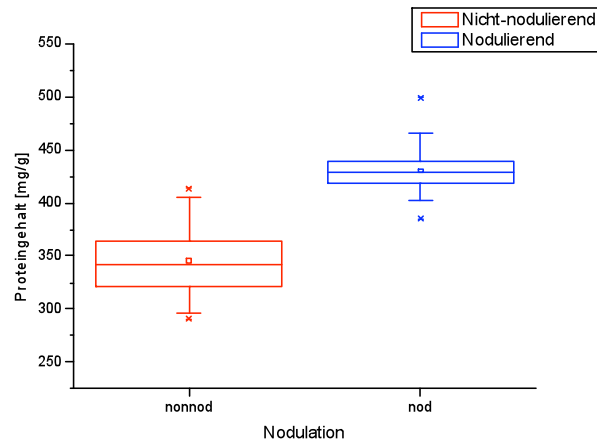
Abb. 12: Das TKG (A) und die Hülsenanzahl (B) von nodulierenden und nicht-nodulierenden Sojabohnen.

## Sameninhaltsstoffe

Diese Ergebnisse lassen sich auch gut mit den mittels NIRS gemessenen Protein- und Ölgehalten in den Samen ergänzen, denn auch hier zeigt sich, dass im Falle des Proteins (Abb. 13 A) die nodulierenden Sojabohnen höhere Werte aufweisen. Der Ölgehalt (Abb. 13 B) ist dementsprechend niedrig in den nodulierenden und hoch in den nicht-nodulierenden Sojabohnen. Die NIRS-Untersuchung der Samen ergab, dass der

Proteingehalt der nodulierenden Sojabohnenlinien im Durchschnitt bei  $430 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$  liegt, der der nicht-nodulierenden Linien hingegen nur bei  $345 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ .

**A**



**B**

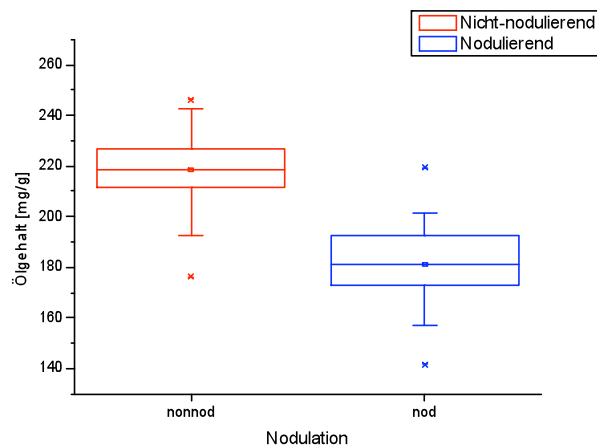


Abb. 13: Proteingehalt (A) und Ölgehalt (B) der nodulierenden und nicht-nodulierenden Sojabohnen.

Der Ölgehalt der Samen liegt in der Gruppe der nodulierenden Sojabohnen im Durchschnitt bei  $181 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ , in der Gruppe der nicht-nodulierenden Sojabohnen bei  $218 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ .

## Statistik

Für die einfachen Varianzanalysen wurde das GLM-Verfahren des SAS-Programms (SAS Institut, 1988) verwendet und die LSM (Least Mean Squares, Kleinste Mittlere Quadrate) betrachtet, da wir Gruppen mit unbalancierten Daten hatten, denn von den 120 Linien mit Wiederholungen von zwölf Linien (unvollständige Blockanlage) waren 39 nicht-nodulierende und 86 nodulierende Linien. Sieben Linien spalteten noch für das Merkmal Nodulation und wurden so für die statistische Auswertung ignoriert. Die Tabelle 1 gibt eine Übersicht über die Ergebnisse der einfachen Varianzanalysen und der Korrelationsanalysen, wobei die wichtigsten innerhalb der anderen Kapitel erörtert und diskutiert werden.

Tab. 1: Übersicht über die Ergebnisse der Korrelationsanalysen.

\*\*\*:  $p < 0,0001$

	Hue	Sat	Bright	R	G	B
SPAD 3	0,93 ***	-0,92 ***	-0,94 ***	-0,91 ***	-0,94 ***	0,86 ***
Hue	1,00	-0,93 ***	-0,90 ***	-0,92 ***	-0,90 ***	0,94 ***
Sat	-0,93 ***	1,00	0,90 ***	0,85 ***	0,90 ***	-0,96 ***
Bright	-0,90 ***	0,90 ***	1,00	0,94 ***	1,00 ***	-0,80 ***
R	-0,92 ***	0,85 ***	0,94 ***	1,00	0,94 ***	-0,78 ***
G	-0,90 ***	0,90 ***	1,00 ***	0,94 ***	1,00	-0,80 ***
B	0,94 ***	-0,96 ***	-0,80 ***	-0,78 ***	-0,80 ***	1,00
Protein	0,80 ***	-0,81 ***	-0,79 ***	-0,80 ***	-0,79 ***	0,78 ***
Oil	-0,70 ***	0,67 ***	0,66 ***	0,68 ***	0,66 ***	-0,66 ***

	SPAD 3	Protein	Oil
SPAD 3	1,00	0,75 ***	-0,64 ***
Hue	0,93 ***	0,80 ***	-0,70 ***
Sat	-0,92 ***	-0,81 ***	0,67 ***
Bright	-0,94 ***	-0,79 ***	0,66 ***
R	-0,91 ***	-0,80 ***	0,68 ***
G	-0,94 ***	-0,79 ***	0,66 ***
B	0,86 ***	0,78 ***	-0,66 ***
Protein	0,75 ***	1,00	-0,85 ***
Oil	-0,64 ***	-0,85 ***	1,00

Neben den einfachen Varianzanalysen wurde noch eine zweifache Varianzanalyse angewandt, um erkennen zu können, ob der Einfluss der F<sub>2</sub>-Linien-Gruppen den Einfluss der Nodulation bei den Merkmalen Wuchshöhe und Reifezeit überdeckt. Dazu wurden in der GLM Methode zwei Faktoren festgelegt: die Nodulation mit den Ausprägungsstufen nodulierend und nicht-nodulierend, sowie die Gruppe mit den sechs Ausprägungsstufen zurückzuführen auf die sechs ausgewählten F<sub>2</sub>-Linien. Die zweifache Varianzanalyse hat ergeben, dass bei der Reifezeit die Wahrscheinlichkeit des Einflusses der Gruppe bei  $p < 0.0001$  und bei der Nodulation bei  $p = 0.0028$  liegt. Bei der Wuchshöhe liegt der Einfluss der Gruppe bei  $p < 0.0001$ , der der Nodulation bei  $p = 0.003$ .

Um den Zusammenhang zwischen dem Proteingehalt der Samen und den SPAD-Werten zu testen, wurde eine Regressionsanalyse verwendet. In Abbildung 14 ist die Regressionsgerade mit dem 95% Konfidenzband und dem 90% Vorhersageband dargestellt. Die Punkte beschreiben die einzelnen Linien mit ihren Mittelwerten in SPAD und Proteingehalt, der Korrelationskoeffizient beträgt  $r = 0,759$ .

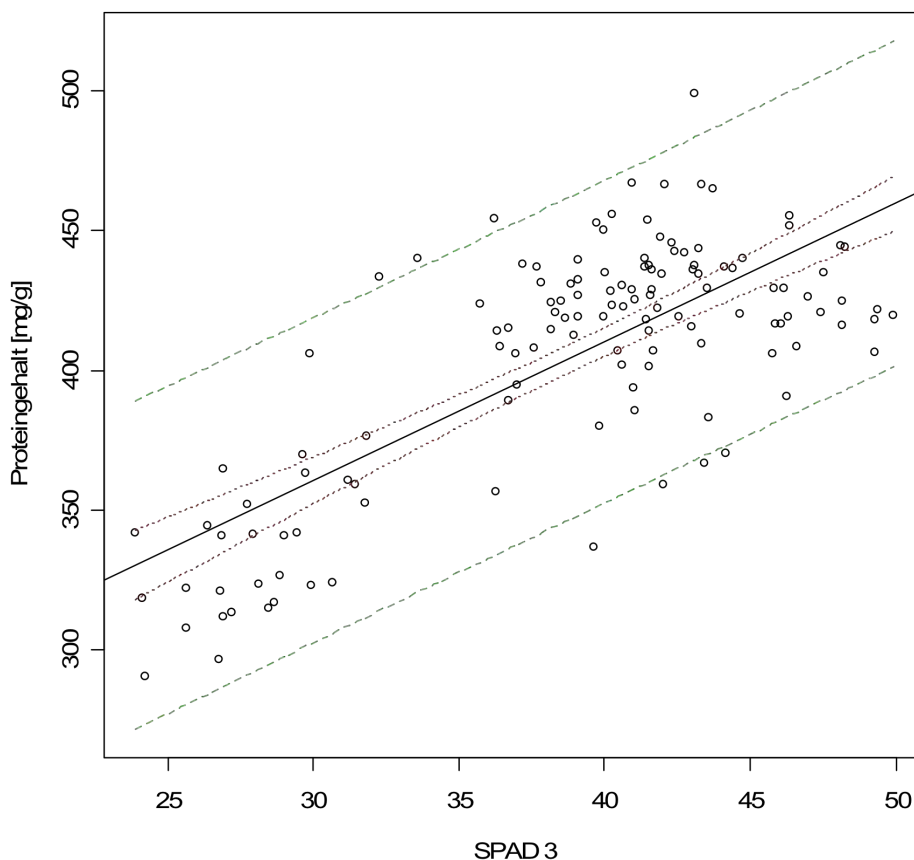


Abb. 14: Regression zwischen den SPAD-Werten vom 15. Juli 2008 und dem Proteingehalt der Samen. Rot: 95% Konfidenzband; Grün: 90% Vorhersageband

## Diskussion

Anhand von nahezu isogenen Linien wurden der Chlorophyllgehalt der Blätter, Ertragsmerkmale und der Protein- sowie der Ölgehalt der Samen untersucht, um phänotypische Unterschiede zwischen nodulierenden und nicht-nodulierenden Sojabohnen herauszufinden.

Eine Schwierigkeit ist dabei, dass die Stickstofffixierung ein sehr komplexer und sensibler Vorgang ist, der nicht nur von den genetischen Faktoren der Pflanze, sondern auch von denen der Bakterien, von äußeren Umwelteinflüssen und Interaktionen abhängig ist (Gwata et al., 2004, p. 154). Im vorliegenden Versuchsaufbau wurde allerdings darauf geachtet, diese Einflüsse möglichst gering zu halten durch Nutzung nahezu isogener Linien für geringe genetische Variabilität und durch den Anbau auf einem kleinen Feld für geringe Umweltschwankungen.

Die Nodulierung war bei den Pflanzen, die eine Symbiose eingehen konnten, deutlich ausgeprägt. Dies liegt wahrscheinlich auch daran, dass das Anbaufeld schon über mehrere Jahre mit Soja bebaut wurde und so eine Anreicherung an Rhizobien stattgefunden hat (Provokationsstandort). Aus den absterbenden Wurzelknöllchen werden nämlich mehr Rhizobien entlassen, als ursprünglich eingewandert sind (Strasburger et al., 2002, p. 499). Diese starke Nodulierung fördert die Deutlichkeit der Unterschiede zwischen nodulierenden und nicht-nodulierenden Linien.

## Chlorophyllgehalt

Bei der Chlorophyllgehaltsmessung konnte festgestellt werden, dass innerhalb der Vegetationsperiode bei nodulierenden Sojabohnenlinien ein deutlicher Anstieg des Chlorophyllgehalts der Blätter stattgefunden hat und nur zum Ende der Vegetationsperiode eine Verringerung eingetreten ist. Bei nicht-nodulierenden Sojabohnenlinien hingegen war über die Vegetationsperiode eine stetige Abnahme des Chlorophyllgehalts zu erkennen.

Am Anfang ist der Chlorophyllgehalt bei beiden Typen gleich hoch, da die Nodulationsform in einem so frühen Stadium noch keine Auswirkungen zeigt. Im Gegenteil, zu Anfang kostet es der Pflanze viel Energie, die Knöllchen aufzubauen. Die Energie für die ersten Blätter kann die Pflanze großteils aus dem Samen und dann aus dem Boden beziehen. Der Anstieg des SPAD-Werts der nodulierenden Sojabohnen

kommt zustande, indem diese Pflanzen nach erfolgreicher Nodulierung mehr Stickstoff zu Verfügung haben, um Chlorophyll aufzubauen, als die nicht-nodulierenden. Für den Aufbau des Photosyntheseapparats benötigt die Zelle relativ große Mengen an Stickstoff, so fallen 75% des gesamten Blattstickstoffs nur auf das Chlorophyll (Fritschi & Ray, 2007, p. 92). Außerdem wird Stickstoff im Blatt für die Ribulose-Bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase benötigt, was den Zusammenhang von Blattstickstoffgehalt und Photosyntheserate verdeutlicht (Salvagiotti et al., 2008, p. 2). Die nicht-nodulierenden Sojabohnen benötigen den über die Wurzel aufgenommenen Stickstoff für das Wachstum und können weniger in den Chlorophyllgehalt investieren. Über die Vegetationszeit nimmt der Chlorophyllgehalt weiterhin ab, da Mangel auftritt und der Stickstoff aus den Blättern abgezogen und in die Vermehrungsorgane transportiert wird: „If the overall N supply does not meet soybean requirements, the crop will remobilize N accumulated in leaves to the grain, which diminishes the photosynthetic capacity of the canopy and thus limits the yield potential“ (Salvagiotti et al., 2008, p. 2).

Die Nährstoffverlagerung in die Samen und die Seneszenz (Abreife) der Blätter macht sich auch bei den nodulierenden Pflanzen zu Ende der Vegetationsperiode bemerkbar: der Chlorophyllgehalt sinkt (Salvagiotti et al., 2008, p. 4).

Die SPAD-Werte werden beeinflusst durch Entwicklungsstadium und Alter der Blätter (Šesták in Fritschi & Ray, 2007, p. 97). Diese Beeinflussung kann im vorliegenden Versuch allerdings vernachlässigt werden, da diese durch die Wahl des obersten vollentwickelten Blatts minimiert wird. „Collection of mature, fully irradiated leaves from the top quarter of the soybean canopy proved to be a robust, quick, and simple method for sampling of leaf chlorophyll composition and content“ (Fritschi & Ray, 2007, p. 97).

Allerdings war der Aufgang der Linien ungleichmäßig und so haben Pflanzen in einer Linie mit schlechtem Aufgang einen besseren Zugang zu Licht, Wasser und Nährstoffen gehabt als Pflanzen einer Linie mit gutem Aufgang. Dies könnte die Schwankungen innerhalb der Linien erklären.

Der Vergleich von SPAD-Messung und Rotgehalt in der Bildanalyse ergab in der statistischen Auswertung eine stark negative, hoch-signifikante Korrelation. In der Abb. 10 wird auch deutlich, dass nodulierende und nicht-nodulierende Sojabohnen in der Darstellung gruppiert werden können. Nodulierende Sojabohnen haben einen hohen SPAD-Wert, aber einen geringen Rotanteil, nicht-nodulierende Sojabohnen hingegen

haben einen niedrigen SPAD-Wert, aber einen hohen Rotanteil. Der Rotanteil im Bild ist hoch, wenn dieses besonders grün, also viel Chlorophyll in den Blättern enthalten ist.

Die klare Gruppierung in nodulierende und nicht-nodulierende Sojabohnen kommt folglich so zustande, dass nicht-nodulierende Sojabohnen durch den Stickstoffmangel einen geringen Blattchlorophyllgehalt haben, also einen geringen SPAD-Wert, aber auf dem Foto einen hohen Rotanteil haben. Bei nodulierenden Sojabohnen liegt dies genau umgekehrt. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die Bildanalyse genauso wie die schon übliche SPAD-Messung geeignet ist, um einerseits den Nodulierungstyp von Sojabohnen zu messen, andererseits eine Aussage über die Stickstoffversorgung der Pflanze zu treffen. Ersteres wäre für die Phänotypisierung großer Kreuzungspopulationen in Forschung und Züchtung von Bedeutung, da über die Bildanalyse eine schnelle Selektion vieler Pflanzen für das Merkmal Nodulierung möglich wäre. Letzteres ist für die Landwirtschaft wichtig, da Düngermengen dem Versorgungsstand der Pflanzen angeglichen werden könnten. Ähnliche Ergebnisse wie in unserem Versuch erreichten auch Reum und Zhang bei der Maispflanze, die Stickstoffmangel sowohl mittels SPAD-Messungen als auch mittels Bildanalyse feststellen konnten (Reum & Zhang, 2007, p. 62).

## Reifezeit

Die Reifezeit der Sojabohnen wurde in den zwei Gruppen nodulierend und nicht-nodulierend verglichen. Hierbei haben sich bei einem einfachen Vergleich, wie in Abb. 11 zu erkennen ist, keine Unterschiede feststellen lassen. Durch die geringe genetische Variabilität der Linien konnte im vorliegenden Versuch sichergestellt werden, dass sich die Linien nur in den Genen für Nodulierung und wenigen anderen unterscheiden. Auch der Einfluss der Umwelt auf die Reife war für alle Linien in etwa gleich, da sie an einem Feld an einem Standort angebaut wurden.

Über die zweifache Varianzanalyse konnte jedoch festgestellt werden, dass sowohl die Verwandtschaft, zurückzuführen auf eine der sechs ausgewählten F2-Linien, als auch die Nodulation signifikanten Einfluss auf die Reifezeit haben, was in der einfachen Varianzanalyse nicht erkennbar war.

## Ertragsmerkmale

Es wurden sowohl die Hülsenzahl als auch das TKG gemessen, um den Ertrag schätzen zu können. Die Hülsenzahl beträgt bei nodulierenden Sojapflanzen im Durchschnitt 17,97 Hülsen je Pflanze, bei nicht-nodulierenden Sojapflanzen hingegen nur 11,32. Das TKG liegt bei den nodulierenden Linien im Durchschnitt bei 177, bei den nicht-nodulierenden Linien bei 138.

Durch die vermehrte Stickstoffzufuhr für nodulierende Sojabohnen durch bakterielle N<sub>2</sub>-Fixierung, können die Pflanzen offenbar mehr Vermehrungsorgane anlegen und die Samen auch besser füllen.

Bei der Soja kommt es bei schlechten Umweltbedingungen während der Blütezeit zu einem Blütenabwurf (Lersten & Carlson, 2004, p. 90). Der geringere Hülsenansatz der nicht-nodulierenden Linien könnte mit einem verstärkten Blütenabwurf zusammenhängen, da schon eine schlechtere Stickstoffversorgung der Pflanzen im Vergleich zu den nodulierenden Linien vorhanden war.

## Sameninhaltsstoffe

Die Auswertung von Protein- und Ölgehalt der Samen hat generell große Unterschiede zwischen den zwei Nodulierungsgruppen aufgezeigt. Diese Unterschiede lassen sich auf die bessere N<sub>2</sub>-Versorgung bei der nodulierenden Gruppe zurückführen, da einerseits für die Synthese von Speicherprotein, andererseits für das effektive Arbeiten der Energiegewinnung (Photosynthese) und der Lipidsynthese Stickstoff benötigt wird. Die Deutlichkeit, mit der die Unterschiede im Proteingehalt auftraten, kann auch auf den „high-protein genotype“ BARC-6 zurückgeführt werden (Vollmann et al., 2000, p. 1301). BARC-6 war einer der Kreuzungspartner in der ursprünglichen Kreuzung und zeichnet sich durch eine besonders effektive Nutzung der Stickstoffversorgung und so einen hohen Proteingehalt der Samen aus. Die nodulierenden Linien haben vielleicht die Fähigkeit, den fixierten Stickstoff besonders gut in Speicherprotein umzusetzen, geerbt, wodurch die Unterschiede zu den nicht-nodulierenden Linien noch verstärkt wären.

Die NIRS-Untersuchung der Samen ergab, dass der Proteingehalt der nodulierenden Sojabohnenlinien im Durchschnitt bei 430 g·kg<sup>-1</sup> liegt, der der nicht-nodulierenden Linien hingegen nur bei 345 g·kg<sup>-1</sup>. Der Ölgehalt der Samen liegt in der Gruppe der



nodulierenden Sojabohnen im Durchschnitt bei  $181 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ , in der Gruppe der nicht-nodulierenden Sojabohnen bei  $218 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ .

Die grafische Darstellung von Protein- und Ölgehalt der Samen der zwei Nodulierungsgruppen mittels Boxplots (Abb. 13), wies auf einen Zusammenhang zwischen beiden Messgrößen hin. In unserer statistischen Auswertung dieser Daten wurde dieser Zusammenhang bestätigt: der Pearsonsche Korrelationskoeffizient beträgt  $-0,85$ .

Dieser negative Zusammenhang wurde auch schon in anderen Studien festgestellt: „The relationship between protein and oil content was consistently negative for all growing seasons“ (Vollmann et al., 2000, p. 1302).

Die Umkehrung im Verhältnis von Öl und Protein ist physiologisch bedingt: Sind in Samen schon viele Proteine eingelagert, können nicht mehr gleiche Mengen an Öl eingelagert werden und umgekehrt.

## Schlussfolgerung – Ausblick

Der Vergleich von nodulierenden und nicht-nodulierenden nahezu isogenen Sojabohnenlinien hat ergeben, dass die Nodulation den Blattchlorophyllgehalt, die Hülsenzahl, das TKG sowie den Protein- und Ölgehalt der Samen, aber auch die Reifezeit beeinflusst. Die Wuchshöhe der Sojapflanzen zeigt keine Abhängigkeit von der Nodulation.

Die hier verwendete Methode der Bildanalyse eignet sich, um eine Chlorophyllgehaltsmessung durchzuführen.

Die SPAD-Werte lassen Rückschlüsse über einen möglichen Proteingehalt der Samen zu.

Ein wichtiger nächster Schritt wäre diesen Versuch auf landwirtschaftliche Bedingungen umzulegen, da so ein Provokationsstandort nicht vergleichbar mit einem normalen Feld ist.

Die Bildanalyse sollte auch für die Einzelreihenmessung getestet werden, wo nicht erst einzelne Blätter geerntet und dann fotografiert werden müssen, sondern gleich Fotos auf dem Feld genommen und später mittels Bildanalyseprogramm ausgewertet werden. In diesem Rahmen wäre auch eine Standardisierung der Bildanalyse auf allen Ebenen (Feld, Parzelle, Reihe, etc.) als gängiges Messverfahren erstrebenswert, damit Studien, die diese Methodik verwenden, vergleichbar werden.

Eine weitere interessante Fragestellung, die sich aus den Ergebnissen dieser Arbeit anbietet, ist die Abhängigkeit des Blütenabwurfs von der Stickstoffversorgung der Pflanze und die Auswirkungen auf den Hülsenansatz und den Ertrag. Auch für diese Untersuchung wäre das Arbeiten mit nodulierenden und nicht-nodulierenden Sojabohnen sinnvoll.

## Zusammenfassung

Die Sojabohne zählt auf Grund ihres hohen Protein- und Ölgehalts zu einer der bedeutendsten Kulturpflanzen weltweit. Ziel dieser Studie war, Unterschiede zwischen nodulierenden und nicht-nodulierenden Sojabohnen zu charakterisieren, und die Eignung der Bildanalyse für die Blattchlorophyllgehaltsmessung zu bestimmen.

Es wurden nahezu isogene, nodulierende und nicht-nodulierende Linien auf ihren Chlorophyllgehalt mittels SPAD-Meter und Bildanalyse hin untersucht und weiters der Protein- und Ölgehalt ihrer Samen mit Hilfe des NIRS gemessen. Die nodulierenden Sojabohnen wiesen einen deutlich höheren Blattchlorophyllgehalt, einen höheren Proteingehalt und einen niedrigeren Ölgehalt im Vergleich zu den nicht-nodulierenden Linien auf. Auch das TKG und die Hülsenanzahl waren bei den Knöllchen-bildenden Linien größer. Die Reifezeit ist sowohl von der Verwandtschaft als auch von der Nodulation abhängig. Der Vergleich von SPAD-Werten mit Ergebnissen der Bildanalyse zeigt, dass sich die Bildanalyse zur Bestimmung des Blattchlorophyllgehalts gut eignet. Die statistische Auswertung hat ergeben, dass der Blattchlorophyllgehalt eine Vorhersage auf den Proteingehalt der Sojabohnen zulässt.

Die Nodulation zeigt einen deutlichen Einfluss auf den Blattchlorophyllgehalt, auf Ertragsmerkmale wie Hülsenanzahl und TKG, außerdem auf den Protein- und Ölgehalt der Sojabohne, da sie die Stickstoffzufuhr für die Pflanze deutlich erhöht und so über den Stickstoffhaushalt verschiedene Syntheseprozesse in der Pflanze begünstigt. Je mehr Stickstoff der Pflanze zu Verfügung steht, desto mehr bleibt nach dem Aufbau der Biomasse für die Synthese von Chlorophyll, Enzymen z.B. für die Photosynthese und Speicherprotein. Es können mehr Speicherorgane angelegt werden und diese werden zusätzlich noch besser versorgt.

Insgesamt konnten deutliche Unterschiede zwischen nodulierenden und nicht-nodulierenden Sojabohnen-Linien gemessen und charakterisiert werden.

## Bild- und Tabellenverzeichnis

Abb. 1: Vollmann, J.: Universität für Bodenkultur Wien.

Abb. 2: Strasburger, E., Noll, F., Schenck, H., Schimper, A., Sitte, P., Weiler, E. W. et al. (2002). *Lehrbuch der Botanik für Hochschulen*. Berlin, S. 497.

Abb. 3: <http://ttij.dreamblog.jp/image/free/40KBTTIJ81210VSPAD-502.jpg> (Stand: 24.06.2009)

Abb. 4: Uddling, J., Gelang-Alfredsson, J., Piikki, K. & Pleijel, H. (2007). Evaluating the relationship between leaf chlorophyll concentrations and SPAD-502 chlorophyll meter readings. *Photosynthesis Research* (91), 41.

Abb. 5-6: Vollmann, J.: Universität für Bodenkultur Wien.

Abb. 7-14: Vollmann, J. & Walter, H.: Universität für Bodenkultur Wien, 2008.

Tab. 1: Vollmann, J. & Walter, H.: Universität für Bodenkultur Wien, 2008.

## Literaturverzeichnis

- Adamsen, F.J., Coffelt, T.A., Nelson, J.M., Barnes, E.M., & Rice, R.C. (2000). Method for using images from a color digital camera to estimate flower number. *Crop Science* 40, 704-709.
- Burton, J., Israel, D., & Bishop, P. (2006). Registration of 'Nitrasoy' soybean. *Crop Science* 46, 2709-2710.
- Ewing, R.P., & Horton, R. (1999). Quantitative color image analysis of agronomic images. *Agronomy Journal* 91, 148-153.
- FAO (2009). *FAOSTAT, FAO Prod.Stat.* Abgerufen am 18. Mai 2009 von <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>
- Font, R., del Río-Celestino, M., & de Haro-Bailón, A. (2006). The use of near-infrared spectroscopy (NIRS) in the study of seed quality components in plant breeding programs. *Industrial Crops and Products* 24, 307-313.
- Fritschi, F., & Ray, J. (2007). Soybean leaf nitrogen, chlorophyll content, and chlorophyll a/b ratio. *Photosynthetica* 45 (1), 92-98.
- Gwata, E.T., Wofford, D.S., Pfahler, P.L., & Boote, K.J. (2004). Genetics of promiscuous nodulation in soybean: nodule dry weight and leaf color score. *Journal of Heredity* 95, 154-157.
- Hatem, I., & Tan, J. (2003). Image Analysis. In *Encyclopedia of Agricultural, Food, and Biological Engineering* (S. 517-523). New York: Marcel Dekker.
- Hymowitz, T. (2004). Speciation and Cytogenetics. In Boerma, H.R. & Specht, J.E., *Soybeans: Improvement, Production and Uses* (3. Edition, Bd. 16, S. 97-99). Medison, WI, USA: American Society of Agronomy.
- Karcher, D.E., & Richardson, M.D. (2003). Quantifying turfgrass color using digital image analysis. *Crop Science* 43, 943-951.
- Karcher, D.E., & Richardson, M.D. (2005). Batch analysis of digital images to evaluate turfgrass characteristics. *Crop Science* 45, 1536-1539.
- Konica Minolta Sensing, Inc. (2003). *Chlorophyll meter SPAD-502*. Osaka, Japan.

Lersten, N.R., & Carlson, J.B. (2004). Vegetative Morphology. In Boerma, H.R. & Specht, J.E., *Soybeans: Improvement, Production and Uses* (Bd. 16, S. 49-54). Medison, WI, USA.

León, K., Mery, D., Pedreschi, F., & León, J. (2006). Color measurement in L\*a\*b\* units from RGB digital images. *Food Research International* 39, 1084-1091.

Morrison, M.J., Pietrzak, L.N., & Voldeng, H.D. (1998). Soybean seed coat discoloration in cool-season climates. *Agronomy Journal* 90, 471-474.

Nultsch, W. (2001). *Allgemeine Botanik* (11. Auflage Ausg.). Stuttgart, Deutschland: Georg Thieme Verlag.

Pum, D. (2007). Digitale Bildverarbeitung in der Lebensmittel- und Biotechnologie. Wien: Universität für Bodenkultur.

Reum, D., & Zhang, Q. (2007). Wavelet based multi-spectral image analysis of maize leaf chlorophyll content. *Computers and Electronics in Agriculture* 56, 60-71.

Salvagiotti, F., Cassman, K.G., Specht, J.E., Walters, D.T., Weiss, A., & Dobermann, A. (2008). Nitrogen uptake, fixation and response to fertilizer N in soybeans: A review. *Field Crops Research* 108, 1-13.

SAS Institut. (1988). SAS STAT User's Guide. 6.03. Cary, NC, USA.

Stacey, G., Libault, M., Brechenmacher, L., Wan, J., & May, G.D. (2006). Genetics and functional genomics of legume nodulation. *Current Opinion in Plant Biology* 9, 110-121.

Strasburger, E., Noll, F., Schenck, H., Schimper, A., Sitte, P., Weiler, E. W., et al. (2002). *Lehrbuch der Botanik für Hochschulen* (35. Auflage Ausg.). Berlin, Deutschland: Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg.

Subramanian, S., Stacey, G., & Yu, O. (2007). Distinct, crucial roles of flavonoids during legume nodulation. *Trends in Plant Science* 12 (7), 282-285.

Uddling, J., Gelang-Alfredsson, J., Piikki, K., & Pleijel, H. (2007). Evaluating the relationship between leaf chlorophyll concentrations and SPAD-502 chlorophyll meter readings. *Photosynthesis Research* 91, 37-46.

Vollmann, J., Fritz, C.N., Wagenristl, H., & Ruckenbauer, P. (2000). Environmental and genetic variation of soybean seed protein content under Central European growing conditions. *Journal of Science of Food and Agriculture* 80, 1300-1306.

Williams, L.F., & Lynch, D.L. (1954). Inheritance of a non-nodulating character in the soybean. *Agronomy Journal* (46), S. 28-29.