



Abschlussbericht Teilprojekt 4

Hitzetoleranz bei der Pollenentwicklung von Mais und Weizen

Projektverbund BayKlimaFit

Strategien zur Anpassung von Kulturpflanzen an den Klimawandel

Finanziert durch

Bayerisches Staatsministerium für Umwelt und Verbraucherschutz Rosenkavalierplatz 2 81925 München

Projektnehmer

Universität Regensburg Lehrstuhl für Zellbiologie und Pflanzenbiochemie Prof. Dr. Thomas Dresselhaus Universitätsstraße 31 93053 Regensburg

Tel.: 0941-943-3016/-3017

Fax: 0941-943-3352

E-Mail: thomas.dresselhaus@ur.de

Web: www.cell-biology.uni-regensburg.de

www.bayklimafit.de

Berichtszeitraum:

1. Februar 2016 bis 31. Januar 2019



Inhaltsverzeichnis

1	Zusa	Zusammenfassung			
2	Einfi	Einführung			
	2.1	Hintergrund			
	2.2	Stand der Wissenschaft und Technik			
	2.3	Eigene Vorarbeiten			
3	Ziels	ielsetzung			
4	Ergebnisse und Diskussion				
	4.1	Bestimmung der kritischen KHT-Phasen der Pollenentwicklung			
		4.1.1	Bestimmung der Pollenentwicklungsphasen bei Mais	5	
		4.1.2	Meiose-/ Tetradenstadien sind bei Mais besonders hitzeempfindlich	h 7	
		4.1.3	Bestimmung der kritischen Pollenentwicklungsphasen bei Weizen .	9	
	4.2	RNA-seq zur Identifizierung von Hitzestress-Genen bei Mais			
	4.3	Funktionsanalysen von Hitzestress-Kandidaten-Genen			
5	Verö	eröffentlichungen im Rahmen des Projekts1			
6	Vern	Vernetzungen1			
7	Geplante oder bestehende Industriebeteiligung1				
8	Ausführliche Zusammenfassung				
9	Ausblick				
Lite	eraturv	verzeich	nis	19	
Αb	kürzur	ngsverze	eichnis	21	
Δn	hana			22	

1 Zusammenfassung

Erhöhte Temperaturen und Trockenstress sind unmittelbar mit der globalen Klimaerwärmung korreliert und haben zu Umweltveränderungen geführt die u. a. zu Sterilität und somit zu erheblichen Ertragseinbußen bei Wild- und Nutzpflanzen führen. Hierbei hat sich gezeigt, dass Blütenorgan- und Gametenbildung besonders stressanfällig sind. Bereits kurze Hochtemperaturepisoden für wenige Tage - wie sie auch in Bayern immer häufiger vorkommen - führen zu Pollensterilität und damit zu vermindertem Kornansatz.

Dieses Teilprojekt hat sich daher mit den agrarisch wichtigen Nutzpflanzen Mais und Weizen beschäftigt und zunächst untersucht, welche Pollenentwicklungsphasen besonders kritisch für kurze Hitzestress-Perioden über zwei bis drei Tage sind. Es konnte gezeigt werden, dass die Meiose- und Tetradenstadien besonders empfindlich sind. Mit physiologischen Methoden, Hochdurchsatzsequenzierung (RNA-seq) und Metabolit-Analysen konnte anschließend u. a. gezeigt werden, dass bayerische Weizensorten im Vergleich zu australischen Sorten auf Hitzestress überreagieren und bei Mais der Zucker- und Lipidhaushalt während der Pollenentwicklung bei Hitzestress verändert wird. Hierdurch können Pollen nicht mehr keinem und sind steril. Genregulatoren wurden identifiziert die eine Rolle beim Übergang der jeweiligen Entwicklungsphasen spielen könnten sowie Hitzestress-regulierte Gene kontrollieren. Mehrere Gene für Transkriptionsfaktoren wurden für das sogenannte Genomeditierung ausgewählt. Die genauen Funktionen der selektierten Gene konnten in der Projektlaufzeit nicht mehr untersucht werden.

2 Einführung

2.1 Hintergrund

Die globale Erderwärmung hat einen großen Einfluss auf die Umwelt und führt zu Veränderungen der Ökosysteme und zu neuen Herausforderungen zur Sicherung der Welternährung. Insbesondere zunehmende Trockenheit und Hitze stellen zwei abiotische Hauptfaktoren dar, die einen stark limitierenden Einfluss auf den Ertrag von Nutzpflanzen und die Verbreitung von Wildpflanzen haben. Hitzestress beeinträchtigt hierbei die Samenbildung und somit die Fortpflanzung und den Ertrag von Pflanzen [1 - 5]. So wurde z. B. für kommerzielle Weizenlinien gezeigt, dass kurze Hochtemperaturepisoden (KHTs) für 1 – 2 Tage bei 35 °C oder 3 – 5 Tage bei > 30 °C bereits zur Ertragsverlusten von bis zu 50 % führen können [6] und damit einen großen Einfluss auf die Produktion und die Produktivität von Getreidearten haben. Durch die globale Erwärmung und die zunehmenden Wetterextreme werden KHTs weiter deutlich zunehmen. Die Verbesserung der Hitze-Toleranz ist daher weltweit ein primäres Ziel zur Verbesserung von Nutzpflanzen. Morphologische Untersuchungen haben gezeigt, dass KHTs insbesondere während der Pollenbildung kritisch für den Samenansatz sind und zu signifikanten Ertragsverlusten bei Getreide führen können. Bisher war der Aspekt von KHTs auf die Pollenentwicklung, der zur Pollensterilität bei Gräsern führt, molekular und physiologisch kaum bis gar nicht untersucht [7, 8].

2.2 Stand der Wissenschaft und Technik

Molekulare Ergebnisse aus zahlreichen Hitzestressstudien insbesondere mit Blättern haben gezeigt, dass Pflanzen sehr vielfältig und komplex auf Hitzestress antworten und hierbei mehrere tausend Gene reguliert werden. Durch epigenetische Faktoren können Anpassungen bzw. Veränderungen sogar in die nächste Generation übertragen werden [9]. Die pflanzlichen Schutzmechanismen bestehen dann u. a. in dem Anschalten von Genen für Hitzeantwort-assoziierte miRNAs, Signalmolekülen, Transkriptionsfaktoren und Hitzestressproteinen (HSPs) sowie Antioxidantien-produzierenden Enzymen [2, 3, 10]. Dies führt u. a. zur Einstellung von Wachstumsprozessen durch die Unterdrückung von Antworten des Pflanzenhormons Auxin [11]. Die molekulare KHT-Antwort während der Pollenentwicklung ist jedoch kaum verstanden und nur bei der Modellpflanze Arabidopsis untersucht [12, 13]. KHT-tolerante Mutanten wurden zwar auch bei Weizen bereits identifiziert, die Identität der molekularen Schalter war jedoch zu Projektbeginn unbekannt [14]. Diese Ergebnisse zeigen aber grundsätzlich, dass Mutationen einzelner Gene zu Hitze-Toleranz führen können und solche Mutanten auch durch Genomeditierung bei Nutzpflanzen erzeugt werden können.

2.3 Eigene Vorarbeiten

Bei Vorversuchen im Gewächshaus wurde auch bei Mais festgestellt, dass Pollensterilität insbesondere im Sommer mit hohen Temperaturen (bis 35 °C) und besonders niedriger Luftfeuchtigkeit (unter 20 %) korreliert. Eine Korrelation mit der Bodenfeuchte ist weniger ausgeprägt. Um den Zusammenhang von Pollensterilität und KHTs untersuchen zu können, wurden im Rahmen des Neubaus der Biologie an der Universität Regensburg ein voll klimatisiertes Gewächshaus und zwei Klimakammern gebaut, die es jetzt erstmalig erlaubten, parallel unter ganz kontrollierten Bedingungen KHT-Experimente durchzuführen und anschließend den Hitzestress-Effekt auf die Pollenentwicklung zu untersuchen. Zytologische und physiologische Methoden zur Untersuchung der kritischen Stadien der Pollenentwicklung wurden im Labor ebenso etabliert [15, 16] wie die Methodik der Genomeditierung bei Mais.

3 Zielsetzung

Ziel des Forschungsvorhabens war es daher, bei den Nutzpflanzen Weizen und Mais in drei Arbeitspaketen . . .

- die kritischen Phasen zu identifizieren, bei denen unter KHT-Bedingungen aber guter Wasserversorgung Pollensterilität auftritt; hierbei sollte mit zytologischen und physiologischen Methoden die Pollenbildung mit und ohne KHTs bei Hitze-sensitiven und – toleranten Genotypen vergleichen werden;
- 2.) mit Hochdurchsatzsequenzierung über RNA-seq Gene zu identifizieren, die bei verschiedenen Genotypen in den kritischen Phasen während der KHTs unterschiedlich reguliert werden und mit Hitze-Toleranz/-Sensitivität korreliert sind;

3.) zur Funktionsanalyse sollen bei Mais Kandidatengene für Genomeditierung ausgewählt und gezielt mutiert werden, um so deren Funktion bei der Hitzestressantwort von sich entwickelnden Maispollen untersuchen zu können. Ggf. sollen Mutationen der entsprechenden Gene aus einer Weizenmutantenkollektion über TILLING identifiziert und charakterisiert werden.

Im Berichtszeitraum wurden alle Arbeitspakete bearbeitet. Die Arbeitspakete zu 1.) und 2.) wurden für Mais im Berichtszeitraum abgeschlossen. Während es bei Mais gelungen war mit einer neuen nicht-destruktiven Methode synchrone Pollenentwicklungsstadien zu isolieren, ist dies für Weizen nicht gelungen. Das Arbeitspaket 3.) wurde im Berichtszeitraum begonnen, die genaue Funktionsanalyse der selektierten Gene wird noch zwei bis drei Jahre dauern.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Bestimmung der kritischen KHT-Phasen der Pollenentwicklung

4.1.1 Bestimmung der Pollenentwicklungsphasen bei Mais

Um die jeweiligen Pollenentwicklungsstadien identifizieren zu können, war es zunächst notwendig eine Methode zu entwickeln, die es ermöglicht die jeweiligen Stadien zu erkennen ohne dabei die Pflanzen zerstören zu müssen. Vorherige Berichte haben gezeigt, dass die Entwicklung sehr synchron erfolgt und es bei Mais eine eindeutige Korrelation zwischen Antheren- und Pollenentwicklung gibt [17]. Da die Antheren von Hüllblättern umgeben sind, war es jedoch nicht möglich die Antherenlänge zu messen ohne den männlichen Blütenstand zu entfernen. Wir haben daher die sog. *Leaf Collar Methode* entwickelt, die es ermöglicht synchrone Pollenentwicklungsstadien zu isolieren ohne die Pflanzen zu zerstören [18]. Die Methode basiert darauf vegetative Entwicklungsstadien als Merkmal mit den jeweiligen Pollenentwicklungsstadien zu korrelieren. Mit der sog. *Leaf Collar Methode* konnte im Rahmen des Forschungsvorhabens bei der Mais Inzuchtlinie B73 die Dauer der jeweiligen Pollenentwicklungsstadien von Pollenmutterzellen vor Meiose bis zum reifen dreizelligen Pollen genau bestimmt werden. Antheren und Tassellänge sowie die jeweiligen vegetativen Entwicklungsstadien wurden korreliert (Abbildung 1). Die Identifizierung Stadien-spezifischer Gene (siehe unten) zeigte die hohe Reproduzierbarkeit der Methode, die 2017 publiziert wurde [18].

Vorhergehende Studien die eine Korrelation zwischen Antherenlänge und Pollenentwicklung gezeigt hatten [17], wurden so durch unsere Untersuchungen bestätigt (Abbildung 2A und 2B). Darüber hinaus konnten wir mit der oben beschriebenen Methode [18] die jeweiligen Pollenstadien identifizieren, stark anreichern (i.d.R. jeweils >90 %) und isolieren (Abbildung 2C-2E). Die jeweilig isolierten Pollenfraktionen zeigten 5 – 20 % Verunreinigungen von i.d.R. früheren Entwicklungsstadien, da sich einige Blüten etwas später entwickelten. Abbildung 2E zeigt schematisch den Zusammenhang von Pollenentwicklungsstadien und vegetativen Entwicklungsstadien. Auf Konferenzen wurde uns bereits bestätigt, dass diese Methode für viele Fragestellungen bei Mais sehr hilfreich ist.

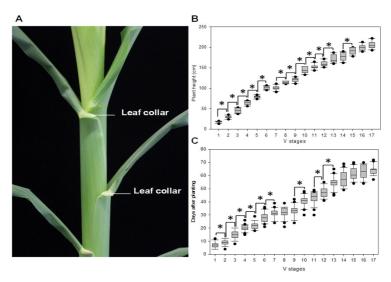


Abbildung 1: Bestimmung der Maisentwicklung mit der sog. *Leaf Collar Methode*. **A**. *Leaf collar* ("Blattkragen")-Strukturen an der Basis von Mais-Blättern. **B**. Entwickungsstadien und die jeweilige Pflanzenhöhe bei der Inzuchtlinie B73. **C**. Vegetative Entwicklungsstadien (V-Stadien) nach Abendroth et al. [19]. Angabe von Tagen nach der Aussaat. *Signifikante Unterschiede zum jeweiligen vorhergehenden Entwicklungsstadium (P<0.001). Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung SD (n = 5 Pflanzen für jedes V-Stadium) bei mindestens 5 unabhängigen Experimenten.

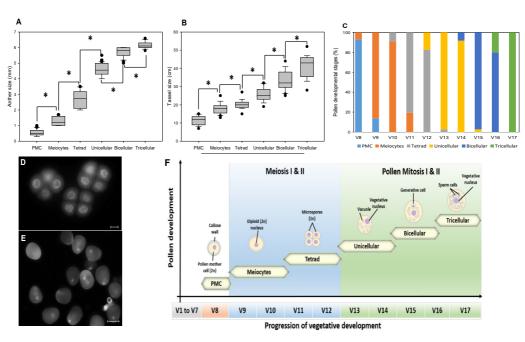


Abbildung 2: Pollen-Entwicklungsstadien der Mais-Inzuchtlinie B73. **A**. Stadien in Bezug zur Antherenlänge, **B**. Tasselgröße und **C**. vegetativer Entwicklung (V-Stadien, s.o.). **D**. Isolierte Tetradenstadien bei V12; Balken = 10μm. **E**. Bei V14 werden uni- und bizelluläre Pollen isoliert, Balken = 50μm. *Signifikante Unterschiede zum jeweiligen vorhergehenden Entwicklungsstadium (P<0.001). Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung SD (n = 5 Pflanzen für jedes V-Stadium) bei mindestens 5 unabhängigen Experimenten. **F** Zusammenfassung von Pollenentwicklungsstadien und vegetativen Entwicklungsstadien (V-Stadien) nach Abendroth et al. [19].

4.1.2 Meiose-/ Tetradenstadien sind bei Mais besonders hitzeempfindlich

Pollen entwickeln sich in Antheren. Daher wurden Antheren von Hitze-gestressten Pflanzen und den jeweiligen Kontrollen isoliert und verglichen. Es zeigte sich, dass moderater Hitzestress bei Mais keinen sichtbaren Einfluss auf die Antherenentwicklung hat (Abbildung 3A). Querschnitte von Antheren zeigten jedoch, dass Hitzestress einen Einfluss auf die Pollenentwicklung innerhalb der Antheren hat und die Pollen schlechter an den sog. Loculenwänden haften (Abbildung 3B-3E). Interessant war die Beobachtung, dass die männlichen Blütenstände (Tassels) nach Hitzestress größer waren (Abbildung 3F und 3G) und sich schneller entwickeln. Vermutlich teilen sich die Zellen bei höheren Temperaturen schneller.

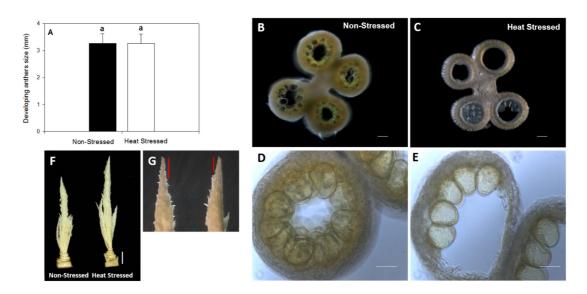


Abbildung 3: Hitzestress beeinflusst die Pollenentwicklung bei Mais. **A.** Antherenlänge wird durch Hitzestress nicht beeinflusst. **B.** Antherenstruktur von Kontrollpflanzen. **C.** Antheren nach Hitzestress enthalten defekte Pollen. **D.** Vergrößerung von B. **E.** Vergrößerung von C. **F.** Nach Hitzestress ist die Tassellänge vergrößert. **G.** Das Tasselmeristem ist nach Hitzestress ebenfalls vergrößert. Daten als ± SDs gezeigt. n = 75 – 100.

Nachdem wir mit der oben beschriebenen nicht-destruktiven und schonenden *Leaf Collor Methode* die jeweiligen Pollenentwicklungsstadien sehr gut bestimmen konnten, wurde moderater Hitzestress für jeweils 48 Stunden gegeben. Hierbei zeigte sich, dass die Mais Pollenentwicklung insbesondere in den Phasen von Meiose und im Tetradenstadium besonders hitzeempfindlich sind (Abbildung 4).

Anschließend haben wir untersucht ob Pollen von Hitze-gestressten Pflanzen sich unter optimalen Bedingungen weiterentwickelt und ggf. keimt. Während die Pollenkeimungsrate bei Kontrollpflanzen *in vitro* ~80 % beträgt, ist diese bei Kontrollpollen auf etwa ~20 % reduziert (Abbildung 5A-5C). Da die *in vitro* Pollenkeimungsexperimente die *in vivo* Situation nicht genau wiedergeben, wurden zusätzlich *in vivo* Experimente an Papillenhaarzellen von Narbenfäden bei Maiskolben gemacht. Durch eine Anilinblau-Färbung wurden Pollenschläuche sichtbar gemacht. Hierbei bestätigten sich die *in vitro* Ergebnisse und nur wenige Pollenkörner keimten auf den Haarzellen (Abbildung 5D-5E).

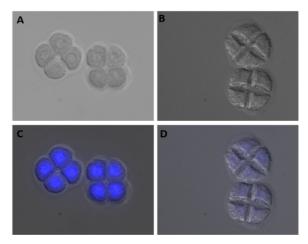


Abbildung 4: Hitzestress hat einen starken Einfluss auf die Bildung von Tetraden nach Meiose. **A.** und **B.** Lichtfeld-mikroskopische Aufnahmen von Tetradenstadien ohne (links) und nach moderatem Hitzestress (rechts). **C.** und **D.** zeigen die jeweiligen Aufnahmen nach DAPI-Färbung zur Visualisierung von DNA und RNA-Gehalten. Die Morphologie und Intensität der DAPI-Färbung ist nach Hitzestress verändert.

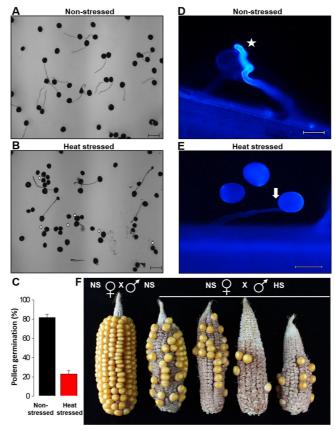


Abbildung 5: Hitzestress während des Tetradenstadiums beeinflusst die weitere Pollenentwicklung und -keimung bei Mais. **A.** *In vitro* Pollen-Keimungsexperiment mit Pollen von Kontrollpflanzen und **B.** von Hitze-gestressten Pflanzen. Pfeile zeigen nicht-gekeimte oder geplatzte Pollenkörner. **C.** Prozent *in vitro* gekeimter Pollen von Kontroll- und Hitze-gestresster Pflanzen. **D.** Anilinblau-Färbung von Kontroll- und **E.** Hitze-gestressten Pollen bei der Keimung auf Papillenhaarzellen von Maiskolben. **F.** Kontroll-Maiskolben (NS) wurden mit Pollen von Kontroll- (NS) und Hitze-gestressten Pflanzen (HS) polliniert. Daten zeigen die mittlere SD. n = 400 - 500. Größenbalken = $100 \ \mu m$.

Da Blütenstände von Mais Millionen von Pollenkörnern bilden, sollte eine Reduzierung der Pollenkeimungsrate auf 20 % immer noch genügend befruchtungsfähige Pollenschläuche bilden. Maiskolben von Kontrollpflanzen wurden daher mit Pollen von Kontrollpflanzen und solchen, die während des Tetradenstadiums Hitze-gestresst wurden, bestäubt. Hierbei zeigte sich eine dramatische Reduzierung des Kornansatzes und damit des Ertrags (Abbildung 5F).

Die Ziele für Arbeitspakete 4.1.1 und 4.1.2 sind somit erreicht und abgeschlossen.

4.1.3 Bestimmung der kritischen Pollenentwicklungsphasen bei Weizen

In 2016 haben wir verschiedene genetisch sehr gut auf Trockenstress charakterisierte australische Weizenlinien aus Adelaide erhalten und getestet. Hierbei zeigte sich, dass keine der Linien besonders empfänglich für moderaten Hitzestress für 2 Tage war (Abbildung 6 zeigt als Beispiel Messungen zur Transpirationsrate als Indikator für eine Hitzestressreaktion und den jeweiligen Phänotyp der Pflanzen). Wir konnten auch keine wie bei Mais gefunden Änderungen in der Pollenentwicklung finden und schließen daher aus unseren Daten, dass die Weizenlinien aus Australien vermutlich bzgl. Pollenentwicklung sehr unempfindlich auf Hitzestress reagieren und diese Eigenschaft seit der Entwicklung aus Europäischen Sorten unbewusst in Züchtungsprogramme eingeflossen ist.

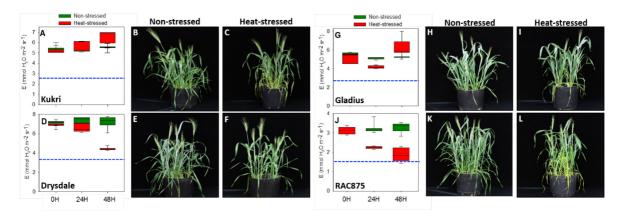


Abbildung 6: Die Transpirationsrate bleibt bei moderatem Hitzestress für zwei Tage bei Australischen Sommerweizensorten nahezu konstant. Physiologische und phänotypische Effekte auf die Sorten Kukri (**A-C**), Drysdale (**D-F**), Gladius (**G-I**) und RAC875 (**J-L**) sind gezeigt. Grüne und rote Boxplots zeigen das Mittel aus Hitze-gestressten Pflanzen und Kontrollpflanzen. Blaue gestrichelte Balken zeigen jeweils die 50% Transpirationsrate der Kontrollpflanzen. 15-20 Pflanzen wurden jeweils untersucht.

Daher wurden anschließend bayerische/europäische Weizenlinien von verschiedenen lokalen Weizenzüchtern bezogen und getestet. Im Vergleich zu Kontrollpflanzen wurden die Temperaturen wie bei den australischen Linien von 21 °C/18 °C (Tag/Nacht) auf 35 °C/30 °C (Tag/Nacht) erhöht. Im Vergleich zu den australischen Linien zeigten alle in Bayern verwendeten Weizenlinien eine große Hitzeempfindlichkeit. Verschiedene Parameter wie Gasaustauschraten, Transpirationsrate und das Schließen der Stomata wurde gemessen. So konnten wir z. B. einen starken Abfall in der Photosynthese- und Transpirationsrate bei allen in Bayern eingesetzten europäischen Linien beobachten. Zwei Tage nach moderatem Hitze-

stress sahen die Pflanzen zudem gelblicher und verwelkter aus (Abbildung 7). Diese Arbeiten wurden teilweise im Rahmen der Bachelor-Arbeit von Anna Weigert durchgeführt, die in 2017 erfolgreich beendet wurde und von Andrew Egesa im Rahmen seiner Master-Arbeit unter der Anleitung von Dr. Kevin Begcy fortgesetzt. In einer Spezialausgabe des *Open Access*-Journals *Agronomy*, welches die beiden BayKlimaFit Teilprojektleiter Prof. Dr. Thomas Dresselhaus (TP4) und Prof. Dr. Ralph Hückelhoven (TP10) unter dem Titel "*Biotic and abiotic stress responses in crop plants*" herausgegeben haben [20], wurde der Vergleich der Australischen und Bayerischen/Europäischen Sommerweizenlinien anschließend publiziert [21].

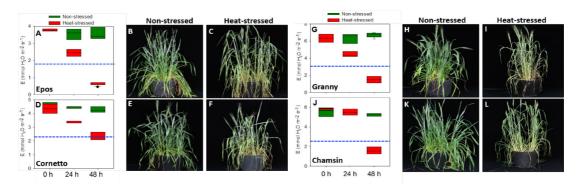


Abbildung 7: Moderater Hitzestress ändert die Transpirationsrate bei bayerischen/europäischen Sommerweizensorten dramatisch. Physiologische und phänotypische Effekte bei den Sorten Epos (**A-C**), Cornetto (**D-F**), Granny (**G-I**) and Chamsin (**J-L**) sind gezeigt. Grüne und rote Boxplots zeigen das Mittel aus Hitze-gestressten Pflanzen und Kontrollpflanzen. Blaue gestrichelte Balken zeigen jeweils die 50% Transpirationsrate der Kontrollpflanzen. 15 - 20 Pflanzen wurden jeweils untersucht.

In der Zusammenfassung zeigen unsere Ergebnisse, dass die australischen Weizensorten gegenüber den bayerischen/europäischen Sorten eine wesentlich geringere Anfälligkeit gegenüber Hitzestress zeigen und es erst nach länger andauernden Hitzestressperioden zu Schäden kommt. Tabelle1 (im Anhang) gibt einen Überblick über die verwendeten Sommerweizensorten. In zukünftigen vergleichenden Experimenten sollte anschließend herausgefunden werden, welche Gene hierfür verantwortlich ist. Leider ist es uns bisher nicht gelungen nach Testen zahlreicher Parameter eine Methode zu entwickeln, mit der - ähnlich wie bei der Leaf Collor Methode bei Mais - die Pollenstadien vorhergesagt werden können ohne die Pflanzen zu zerstören um die Blütenstände im unreifen Stadium zu isolieren. Daher haben wir in ersten Versuchen nur die Lebensfähigkeit und den Stärkegehalt von reifen Pollenkörnern nach Hitzestress sowie die Expression von Hitzestressgenen untersucht. Hierbei konnten wir zeigen, dass sich die Expression der HSF A Gene bei den australischen Weizensorten nach Hitzestress nur gering verändert, während die bayerischen/europäischen Sorten überreagieren und insbesondere Hitzestressfaktoren der Klasse HSF A abschalten oder sehr stark anschalten [21]. Dies führt vermutlich wiederum dazu, dass zahlreiche über HSF A-regulierte Gene ebenfalls fehlreguliert werden. Als Konsequenz enthalten die Pollenkörner der bayerischen/europäischen Sorten nach Hitzestress signifikant weniger Stärke und sind weniger lebensfähig (Abbildung 8). Die Sorte Epos ist besonders anfällig und somit bestens für weitere Untersuchungen geeignet.

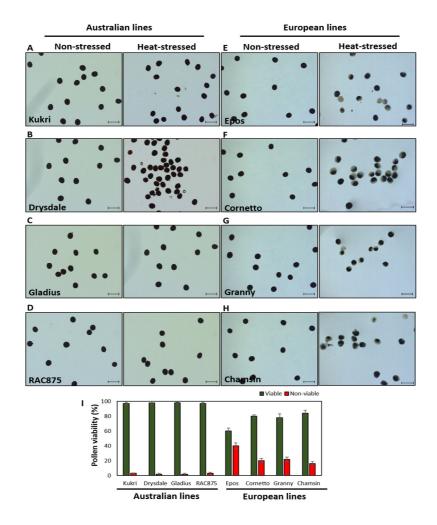


Abbildung 8: Pollen-Lebensfähigkeit in australischen **A.–D.** und europäischen Sommerweizensorten **E.–H.** bei Kontroll- und unter Hitze-Stressbedingungen. Die jeweils getesteten Sorten sind angezeigt. Pollen wurde von Antheren freigesetzt und mit I₂-IK angefärbt. **I.** Vergleich der Pollenlebensfähigkeit in Prozent getesteter Pollen.

Auch wenn wir mit der Charakterisierung der Sommerweizensorten deutlich vorangekommen sind, fehlt nach wie vor eine Methode synchrone Pollenentwicklungsstadien identifizieren zu können. Daher wurden die anschließenden molekularbiologischen Analysen RNA-seq Analysen primär bei Mais durchgeführt.

Die Ziele für Arbeitspaket 4.1.3 sind somit teilweise erreicht; z. Z. sehen wir nur die Möglichkeit mit Einzelzell-Untersuchungen Genexpressionsunterschiede in verschiedenen Pollenentwicklungsstadien zu bestimmen. Auch hierfür muss die genaue Methodik noch etabliert werden, was im Rahmen der Projektlaufzeit nicht möglich war.

4.2 RNA-seq zur Identifizierung von Hitzestress-Genen bei Mais

Bei Mais wurden nach der oben beschriebenen Methode von Begcy und Dresselhaus [18] von sechs Entwicklungsstadien und reifem Pollen mit und ohne Hitzestress Zellen gesammelt und sortiert, RNA extrahiert und nach der Erzeugung von sog. *Libraries* jeweils über 30

Millionen Sequenzen auf einer Illumina-Platform (Hiseq 2000; KFB Regensburg) ermittelt. Darüber hinaus wurden reife Pollen isoliert, nachdem ein vorübergehender Hitzestress durchgeführt worden war. Zum Mapping der Gene wurden die RNA-seq Daten an die BayKlimaFit-assoziierte Bioinformatik-Gruppe von Prof. Dr. Klaus Mayer (Helmholtz-Zentrum München) weitergeleitet. Darüber hinaus hat der für das Projekt eingestellte Wissenschaftler, Dr. Kevin Begcy, durch diese Kooperation und weitere eigene Analysen sehr viele bioinformatische Programme erlernt und konnte die meisten Analysen anschließend selbständig durchführen.

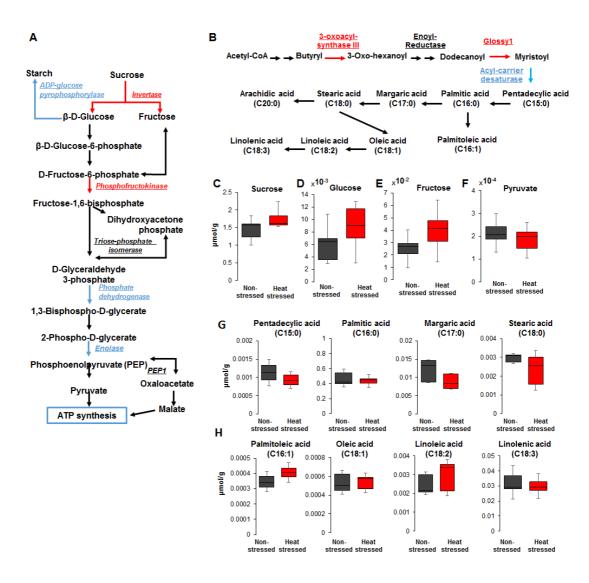


Abbildung 9: Energie- und Lipidstoffwechselwege sind bei Hitzestress im Tetradenstadium der Pollenentwicklung besonders betroffen. Zwei zentrale Stoffwechselwege (**A**. Glykolyse und **B**. Lipidbiosynthese) sind beispielshaft aufgezeigt. Rote Pfeile zeigen Gene für herunterregulierte Enzyme an und hochregulierte Gene sind in rot dargestellt. **C.-F.** Metabolitanalysen zeigen, dass Konzentrationen von Saccharose und deren Monosaccharide erhöht sind, während Pyruvat-Gehalte erniedrigt sind. **G**. und **H**. Fettsäureanalysen zeigen eine Erhöhung von ungesättigten Fettsäuren, während Gehalte an gesättigten Fettsäuren erniedrigt sind.

Bei Mais wurden so über 300 Gene identifiziert, die bei der Pollenentwicklung differentiell exprimiert werden (sog. DEGs). Insbesondere wurden regulatorische Gene und Gene für Enzyme in metabolischen Wegen gefunden (letztere entsprechen etwa 40 % der DEGs). Gerade der Primär- und Energiestoffwechsel wie Glykolyse (Abbildung 9A) und TCA-Zyklus scheinen besonders betroffen, sowie Biosynthesewege für Lipide (Abbildung 9B). So konnten wir beispielsweise zeigen, dass das Gen für eine ADP-Glukose Pyrophosphorylase (GRMZM2G027955), ein Schlüsselenzym der Stärkebiosynthese, stark herunterreguliert wird. Dies wird bestätigt durch Pollenfärbungen, die u. a. zeigen, dass diese weniger Stärke enthalten (nicht gezeigt). Im Gegensatz dazu wird ein Invertase-Gen (GRMZM2G089836) stark hochreguliert, wodurch es zu einer Anhäufung von Glukose und Fruktose kommen sollte. In Kooperation mit Prof. Dr. Wolfram Weckwerth (Universität Wien) haben wir dann untersucht, ob sich die Metabolitzusammensetzung von Pollen mit und ohne Hitzestress mit den identifizierten DEGs korrelieren lässt, um die genauen Ursachen für die Pollensterilität zu finden bzw. zu bestätigen. Abbildung 9C-9F zeigen, dass die Gehalte dieser Zucker deutlich erhöht sind, während das Endprodukt der Glykolyse, Pyruvat, erniedrigt ist und daher vermutlich weniger Energie im TCA-Zyklus hergestellt werden kann. Die DEG-Analysen konnten somit sehr gut mit der Metabolitzusammensetzung korreliert werden. Auch die Lipidzusammensetzung sollte nach DEG-Analysen verändert bzw. erniedrigt sein. Die Untersuchungen zeigten eine Erhöhung von ungesättigten Fettsäuren, während gesättigte Fettsäuren erniedrigt waren. Bei Hitze sollte die Membranzusammensetzung genau anders herum verändert sein. In der Summe reichen diese dramatischen Änderungen im Stärke-, Zuckerund Energiehaushalt bei gleichzeitig veränderter Membranzusammensetzung sicher aus, um Pollenkeimung und Pollenschlauchwachstum zu verringern, wodurch schließlich keine Spermazellen im Eiapparat freigesetzt werden und es zu Sterilität kommt (Abbildung 10).

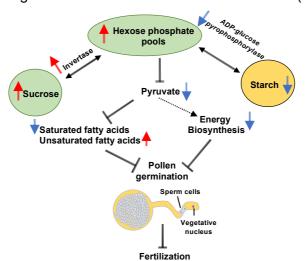


Abbildung 10: Das Modell zeigt, dass Hitzestress in Pollen zu einer Reduzierung des Stärkegehaltes führt, während gleichzeitig durch die stärker exprimierte Invertase freie Zuckerspiegel von Hexosen und deren Phosphate erhöht sind. In der Summe führt dies zu Energiemangel. Ebenfalls erhöht sind ungesättigte Fettsäuren, während gesättigte Fettsäuren erniedrigt sind. Zusammen führen diese Veränderungen zu Problemen bei Pollenkeimung und Pollenschlauchwachstum, und damit zu Sterilität.

Die Ziele für Arbeitspaket 4.2 wurden somit erreicht und um Metabolitanalysen in Kooperation mit Prof. W. Weckwerth erweitert.

4.3 Funktionsanalysen von Hitzestress-Kandidaten-Genen

Bei den oben beschriebenen Genexpressionsanalysen haben wir u. a. herausgefunden, dass beim Übergang der jeweiligen Pollenstadien Mitglieder bestimmter Genfamilien die z. B. für WRKY- und MADS-Box-Transkriptionsfaktoren (TFs) kodieren stark reguliert sind und teilweise ganz spezifisch in bestimmten Stadien exprimiert sind. Darüber hinaus haben wir untersucht, welche putative TF-Bindungsstellen in den über 300 durch Hitzestress regulierten DEGs vorkommen, um Kandidaten für weitergehende Analysen zu selektieren. Abbildung 11 zeigt, dass etwa die Hälfte der DEGs G-Boxen in ihren Promotoren besitzen. Bei Reis wurde neulich gezeigt, dass G-Boxen insbesondere von bZIP, bHLH und NAC TFs gebunden werden, die Blattalterungsprozesse regulieren [22]. Sowohl *ZmNAC86* und *Zmb-ZIP62* gehören zu den stark hochregulierten TFs nach Hitzestress und zählen somit zu den Kandidatengenen für weitergehende Funktionsanalysen. Am stärksten sind Gene für sog. MYB TFs nach Hitzestress hochreguliert (*ZmMYB22*, *ZmMYB40*, *ZmMYBR52* und *ZmMYBR95*). MYB TF-Bindungsstellen wie Myb2 und CT-reiche Elemente wurden ebenfalls in oben beschriebenen DEGs gefunden (siehe auch Abbildung 11).

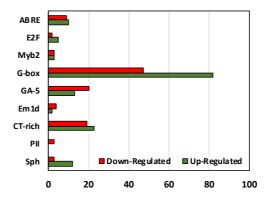


Abbildung 11: Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren in Promotoren von über 300 Hitzestress-regulierten DEGs. Die jeweiligen Bindungsstellen in hoch- bzw. herunterregulierten Genen sind in absoluten Zahlen gezeigt. Etwa 50 % der DEGs enthalten sog. G-Boxen.

Funktionsanalysen von fünf selektierten MADS- und MYB-TFs wurden inzwischen begonnen. Diese Analysen sollen jetzt insbesondere im Rahmen der Promotionsarbeit von Xingli Li unter der Anleitung von Dr. Kevin Begcy durchgeführt werden. Für zwei MADS-Box Gene wurden bereits CRISPR/cas-Genkonstrukte hergestellt um die Genfunktion(en) auszuschalten und die genaue Funktion dieser Gene herausfinden zu können. Das Ausschalten von Genen bei Mais durch Genomeditierung mit dem CRISPR/Cas-System [23] wurden in den vergangen zwei Jahren in Regensburg etabliert. Die Herstellung der Pflanzen und die detaillierten Analysen werden noch zwei bis drei Jahre in Anspruch nehmen und gehen deutlich über die Projektlaufzeit hinaus.

In der Summe wurde auch das Arbeitspaket 4.3 mit der Selektion von Hitzestress-Kandidatengenen und der Initiierung von Genom-editierten Maispflanzen erfolgreich bearbeitet.

5 Veröffentlichungen im Rahmen des Projekts

Publikationen

Begcy, K., Nosenko, T., Fragner, L., Weckwerth, W., and Dresselhaus, T. Male sterility in maize caused by transient heat stress during the tetrad stage of pollen development. *In Begutachtung bei Plant Physiology*.

Dresselhaus, T., and Hückelhoven, R. (2019) <u>Biotic and abiotic stress responses in cropplants.</u> *MDPI Open Access Publisher.* 252 Seiten. ISBN 978-3-03897-464-2.

Dresselhaus, T., and Hückelhoven, R. (2018): Biotic and abiotic stress responses in crop plants. *Agronomy*, **8**, 267.

Begcy, K., and Dresselhaus, T. (2018): Epigenetic responses to abiotic stresses during reproductive development in cereals. *Plant Reproduction* **31**, 343-355.

Begcy, K., Weigert, A., Egesa, A.O., and Dresselhaus, T. (2018): Compared to Australian cultivars, European summer wheat (*Triticum aestivum*) overreacts when moderate heat stress is applied at the pollen development stage. *Agronomy*, **8**, 99.

Zhao, P., Begcy, K., Dresselhaus, T., and Sun, M.X. (2017): Does early embryogenesis in eudicots and monocots involve the same mechanism and molecular players? *Plant Physiology* **173**, 130-142.

Begcy, K., and Dresselhaus, T. (2017): Tracking maize pollen development by the Leaf Collar Method. *Plant Reproduction* **30**, 171-178.

Poster

Begcy, K., Nosenko, T., Fragner, L., Weckwerth, W., Mayer, K.X, and Dresselhaus, T. "Temperature stress-induced male sterility during pollen development in maize". *45th International Maize Genetics Conference* (Saint-Malo, France), 22.-25. März 2018.

Li, X., Dresselhaus, T., and Begcy, K. "Effects of heat stress on bicellular pollen development". *45th International Maize Genetics Conference* (Saint-Malo, France), 22.-25. März 2018.

Begcy, K., Nosenko, T., Mayer, K.X., and Dresselhaus, T. "Temperature stress-induced male sterility during pollen development in maize". *Conference on Plant Biology of the Next Generation* (Freising), 11.–13. Oktober 2017.

Begcy, K., and Dresselhaus, T. "Heat stress severely affects pollen development in maize." Cold Spring Harbour Asia (CSHA) Conference - Latest Advances in Plant Development and Environmental Response (Awaji, Japan), 29. November – 2. Dezember 2016.

Vorträge

Begcy, K., and Dresselhaus, T. "Male sterility induced by increased temperature during tetrad stage". Vortrag auf dem *2nd European Molecular Maize Meeting* (Gent, Belgien), 3.– 5. Mai 2017.

6 Vernetzungen

- Prof. Dr. Peter Langridge (ACPFG Adelaide, Australien): Hitze-/Trockenstressexperte; Unterstützung bei der Projektplanung und Bereitstellung von australischen Weizenlinien;
- Bayerische Weizenzüchter (Saatzucht Bauer GmbH und Secobra Saatzucht GmbH):
 Bereitstellung lokaler Weizenlinien für Hitzestressexperimente;
- Prof. Dr. Klaus X. Mayer (Helmholtz-Zentrum München): Unterstützung bei bioinformatische Analysen;
- Prof. Dr. Wolfram Weckwerth (Universität Wien): metabolomische Analysen;
- Prof. Dr. Ralph Hückelhoven: gemeinsame Herausgabe einer Spezialausgabe in *Agronomy* und eines Buches zum Thema "*Biotic and abiotic stress responses in crop plants*".

7 Geplante oder bestehende Industriebeteiligung

Siehe unter 6. (Vernetzungen): nach dem Austesten sehr gut auf Trockenstress geprüfter australischer Weizenlinien wurden anschließend lokale bayerische Linien der Firmen Saatzucht Bauer GmbH in Obertraubling und Secobra Saatzucht GmbH in Moosburg an der Isar getestet.

8 Ausführliche Zusammenfassung

Erhöhte Temperaturen und Trockenstress sind unmittelbar mit der globalen Klimaerwärmung korreliert und führen zu Umweltveränderungen, zu denen auch z. T. erhebliche Ertragseinbußen bei Wild- und Nutzpflanzen zählen. Hierbei hat sich gezeigt, dass reproduktive Entwicklungsprozesse bei Pflanzen wie die Blütenorgan- und Gametenbildung wesentlich anfälliger sind als vegetative Entwicklungsvorgänge. Hitze- und Trockenstress führt insbesondere zu Pollensterilität, zu ausgetrocknetem Narbengewebe auf dem die Pollenkörner nicht keimen können, dem Pseudo-Ansatz steriler Samen und der Bildung kleiner Körner nach erfolgreicher Befruchtung. Mit Abstand am sensitivsten für kurze Hochtemperaturepisoden (KHTs) für wenige Tage, die auch in Bayern besonders Klima-relevant sind, ist vermutlich die Pollenbildung. Dieses Teilprojekt beschäftigte sich daher mit den agrarisch wichtigen Nutzpflanzen Mais und Weizen und untersuchte zunächst welche Pollenentwicklungsphasen besonders kritisch für KHTs sind und zu sterilem Pollen führen. Durch Hochdurchsatzsequenzierung (RNA-seq) sollten Gene identifiziert und funktionell durch Genomeditierung und Mutantenanalysen auf veränderte KHT-Toleranz untersucht werden. Mit diesem Projekt sollte unser (molekulares) Verständnis über die Hitzestress-verursachte Pollensterilität verbessert werden mit dem langfristigen Ziel Hitzestresstolerante Nutz- und Wildpflanzen selektieren zu können und den Genpool zu verbessern.

Mit Dr. Kevin Begcy konnte ein Wissenschaftler aus den USA für das Forschungsvorhaben gewonnen werden, der bereits über umfangreiche Erfahrungen auf dem Gebiet der Hitzestressforschung an Getreiden (Reis und Weizen) verfügt und über diese Thematik promoviert hat. Experimentell konnte anhand der sog. Leaf Collar-Methode bei Mais zunächst festgestellt werden, in welchem Entwicklungsstadium sich Pollen der Inzuchtlinie B73 jeweils befindet. Diese Methode wurde in 2017 publiziert und ein allgemeiner Übersichtsartikel zu Hitzestress bei Getreide in 2018.

Durch moderaten Hitzestress für 2 Tage bei 35°C wurden anschließend Pflanzengruppen zu unterschiedlichen Pollenentwicklungsstadien gestresst und der Effekt physiologisch untersucht. Hierbei haben sich Meiose- und Tetradenstadien bei Mais als besonders hitzeempfindlich erwiesen. Von mehreren Pollen-Entwicklungsstadien ohne Hitzestress und nach Hitzestress wurden jeweils Zellen gesammelt, sortiert und RNA-seq Analysen durchgeführt. Zum Mapping der Gene wurden die erzeugten RNA-seq Daten an die BayKlimaFit-assozierte Bioinformatik-Gruppe am Helmholtz-Zentrum München weitergeleitet. Analysen zeigen, dass von über 300 Hitzestress-regulierten Genen insbesondere solche aus dem Energieund Lipidstoffwechsel betroffen sind. Darüber hinaus wurden Stadien-spezifische und Hitze-Stress-korrelierte Genregulatoren identifiziert, deren Funktion mit und ohne Hitzestress jetzt durch Geneditierung untersucht werden soll.

Bei Weizen konnte keine Methode etabliert werden, die es erlaubt synchrone Pollenentwicklungsstadien für molekulare Untersuchungen zu isolieren. Im Vergleich zwischen australischen Hitzestress-angepassten und bayerischen/europäischen Sommerweizensorten konnte aber gezeigt werden, dass die europäischen Sorten auf Hitzestress überreagieren und hier großes Potential für die Entwicklung angepasster Hochleistungssorten besteht. Diese Untersuchungen wurden 2018 in einer Spezialausgabe der Fachzeitschrift Agronomy publiziert, die gemeinsam von den Teilprojektleitern Prof. Dr. Thomas Dresselhaus und Prof. Dr. Ralph Hückelhoven herausgegeben wurde.

In der Summe wurden alle geplanten Projektziele bei Mais erreicht und mit den durchgeführten Metabolituntersuchungen zusätzliche und ergänzende Experimente durchgeführt. Bei Weizen konnten aufgrund der Probleme bei oben beschriebener Methode nicht alle geplanten Experimente durchgeführt werden. Für Funktionsanalyen wurden daher ausschließlich Mais-Gene selektiert.

9 Ausblick

Wie oben beschrieben wurden die Ziele der jeweiligen Arbeitspakete fast alle erreicht. Insgesamt kann das Projekt jedoch nur als Einstieg in die Untersuchungen zum molekularen Verständnis über die Mechanismen zum Einfluss von kurzen Hochtemperaturepisoden auf die Pollensterilität bei Nutzpflanzen, insbesondere auf Getreide wie Weizen und Mais, gesehen werden. Da Funktionsanalysen der jetzt identifizierten Gene bei Weizen und Mais wird sich noch über mehrere Jahre hinziehen, bis Strategien für die Pflanzenzucht entwickelt werden können. Um Hitzestress-tolerante Sorten basierend auf Wissen zu erzeugen, ist noch erheblicher Forschungs- und Entwicklungsaufwand notwendig.

Herr Dr. Kevin Begcy ist mittlerweile auf eine Professur an die University of Florida in Gainesville berufen worden und wird die Stelle zum 1. Februar 2019 antreten. Da er an der Universität Regensburg den Status eines Gastwissenschaftlers genießen wird und wir den Doktoranden Xingli Li in Regensburg gemeinsam weiterbetreuen, werden Funktionsanalysen einiger selektierter Gene noch mindestens über zwei Jahre weiter durchgeführt werden. Auch ist geplant langfristig zu kooperieren. Herr Begcy wird primär an Hitzestress bei Weizen und Reis arbeiten, während der Partner in Regensburg sich auf Mais fokussieren möchte. Zur Fortführung des Projekts müssen weitere Fördermittel beantragt werden. Durch den recht erfolgreichen Einstieg in diese hochaktuelle Forschungsthematik sind wir optimistisch, dass dies gelingt.

Literaturverzeichnis

- [1] Barnabas, B., Jager, K., and Feher, A. (2008): The effect of drought and heat stress on reproductive processes in cereals. *Plant Cell Environ.* **31**, 11-38.
- [2] Bita, C.E., and Gerats, T. (2013): Plant tolerance to high temperature in a changing environment: scientific fundamentals and production of heat stress-tolerant crops. *Front. Plant Sci.* **4**, 273.
- [3] Gross, Y., and Kigel, J. (1994): Differential sensitivity to high-temperature of stages in the reproductive development of common bean (*Phaseolus vulgaris* L). *Field Crop Res.* **36**, 201-212.
- [4] Zinn, K.E., Tunc-Ozdemir, M., and Harper, J.F. (2010): Temperature stress and plant sexual reproduction: uncovering the weakest links. *J. Exp. Bot.* **61**, 1959-1968.
- [5] Chen, C., Begcy, K., Liu, K., Folsom, J.J., Wang, Z., Zhang, C., and Walia, H. (2016): Heat stress yields a unique MADS box transcription factor in determining seed size and thermal sensitivity. *Plant Physiol.* **171**, 606-622.
- [6] Asseng, S., Foster, I., and Turner, N.C. (2011): The impact of temperature variability on wheat yields. *Global Change Biol.* **17**, 997-1012.
- [7] Fleury, D., Jefferies, S., Kuchel, H., and Langridge, P. (2010): Genetic and genomic tools to improve drought tolerance in wheat. *J. Exp. Bot.* **61**, 3211-3222.
- [8] Giorno, F., Wolters-Arts, M., Mariani, C., and Rieu, I. (2013): Ensuring reproduction at high temperatures: The heat stress response during anther and pollen development. *Plants* **2**, 489-506.
- [9] Wibowo, A., Becker, C., Marconi, G., Dürr, J., Price, J., Hagmann, J., Papareddy, R., Putra, H., Kageyama, J., Becker, J., Weigel, D., and Gutierrez-Marcos, J. (2016): Hyperosmotic stress memory in Arabidopsis is mediated by distinct epigenetically labile sites in the genome and is restricted in the male germline by DNA glycosylase activity. *Elife* **5**, e13546.
- [10] Müller, F., and Rieu I. (2016): Acclimation to high temperature during pollen development. *Plant Reprod.* **29**, 107-118.
- [11] Dinler, B.S., Demir, E., and Kompe, Y.O. (2014): Regulation of auxin, abscisic acid and salicylic acid levels by ascorbate application under heat stress in sensitive and tolerant maize leaves. *Acta Biol. Hung.* **65**, 469-480.
- [12] Wilson, Z.A., and Zhang, D.B. (2009): From Arabidopsis to rice: pathways in pollen development. *J. Exp. Bot.* **60**, 1479-1492.
- [13] Larkindale, J., Hall, J.D., Knight, M.R., and Vierling, E. (2005): Heat stress phenotypes of Arabidopsis mutants implicate multiple signaling pathways in the acquisition of thermotolerance. *Plant Physiol.* 138, 882-897.
- [14] Mullarkey, M., and Jones, P. (2000): Isolation and analysis of thermotolerant mutants of wheat. *J. Exp. Bot.* **51**, 139-146.
- [15] Dresselhaus, T., Lausser, A., and Marton, M.L. (2011): Using maize as a model to study pollen tube growth and guidance, cross-incompatibility and sperm delivery in grasses. *Annals Bot.* **108**, 727-737.
- [16] Juranic, M., Srilunchang, K.O., Krohn, N.G., Leljak-Levanic, D., Sprunck, S., and Dresselhaus, T. (2012): Germline-specific MATH-BTB substrate adaptor MAB1 regulates spindle length and nuclei identity in maize. *Plant Cell* 24, 4974-4991.
- [17] Chang, M.T., and Neuffer, M.G. (1989): Maize microsporogenesis. Genome 32, 232-244.
- [18] Begcy, K., and Dresselhaus, T. (2017): Tracking maize pollen development by the Leaf Collar Method. Plant Reproduction 30, 171-178
- [19] Abendroth, L.J., Elmore, R.W., Boyer, M.J., and Marlay, S.K. (2011): Corn growth and development. PMR 1009. Iowa State University Extension. *Ames, Iowa*.

- [20] Dresselhaus, T., and Hückelhoven, R. (2018): Biotic and abiotic stress responses in crop plants. *Agronomy*, **8**, 267.
- [21] Begcy, K., Weigert, A., Egesa, A.O., and Dresselhaus, T. (2018): Compared to Australian cultivars, European summer wheat (*Triticum aestivum*) overreacts when moderate heat stress is applied at the pollen development stage. *Agronomy* **8**, 99.
- [22] Liu, L., Xu, W., Liu, H., and Lin, Y. (2016): W-box and G-box elements play important roles in early senescence of rice flag leaf. *Sci. Rep.* **6**, 20881.
- [23] Char, S.N., Neelakandan, A.K., Nahampun, H., Frame, B., Main, M., Spalding, M.H., Becraft, P.W., Meyers, B.C., Walbot, V., Wang, K., and Yang, B. (2017): An Agrobacterium-delivered CRISPR/Cas9 system for high-frequency targeted mutagenesis in maize. *Plant Biotechnol. J.* **15**, 257-268.

Abkürzungsverzeichnis

o Anthese: Blütenentfaltung, Blühen

BCP: zwei-zellige Mikrosporen nach der ersten Pollenmitoseteilung
 CRISPR/cas: Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat and

Cas9-Endonuklease Editierungssystem zur gezielten Einführung von

Mutationen

o DAPI: 4',6-Diamidin-2-Phenylindol, ein Fluoreszenzfarbstoff für DNA

o DEG: differentiell exprimiertes Gen

o FDA: Fluoresceindiacetate, ein Lebendfarbstoff

o HSP: Hitzestress-Protein

o I₂K: Methylencyclobutan, ein Aufhellungsmittel zur besseren Kontrastierung

KHTs: kurze HochtemperaturepisodenPMCs: Pollenmutterzellen vor der Meiose

o RNA-seq: Hochdurchsatz-Sequenzierung von RNA, insbesondere mRNA

o SD: Standardabweichung

o TCA-Zyklus: Krebs-Zyklus, der zentrale Stoffwechselweg bei Eukaryonten

o TCP: dreizelliger reifer Pollen

o UCP: einzellige Mikrosporen nach der Meiose

o Tassel: männlicher Blütenstand bei Mais

o TILLING: Methode um zufällige Mutationen in Genomen zu identifizieren

(Targeted Induced Local Lesions In Genomes)

TF: Transkriptionsfaktor (Genregulator)

Anhang

Tabelle 1: Liste der Sommerweizensorten die in diesem Projekt verwendet wurden. Die Ursprungsländer und der jeweilige Blühzeitpunkt nach Aussaat bei Standardgewächshausbedingungen in Regensburg sind angegeben.

Sorte	Ursprung	Blühzeitpunkt
Kukri	Australien	40 ± 1 Tage
Drysdale	Australien	48 ± 1.5 Tage
Gladius	Australien	49 ± 1.8 Tage
RAC875	Australien	45 ± 2.3 Tage
Epos	Tschechien	52 ± 2.4 Tage
Cornetto	Deutschland	57 ± 1.1 Tage
Granny	Tschechien	50 ± 1.6 Tage
Chamsin	Deutschland	53 ± 2 Tage