

Abschlussbericht Teilprojekt 2

Fertilität und Hitzetoleranz bei Mais

Projektverbund

BayKlimaFit 2 – Starke Pflanzen im 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.: 0941-9433016 (Sekretariat: 0941-9433017)
Fax: 0941-9433352
E-Mail: thomas.dresselhaus@ur.de
WWW-Homepage: <https://go.ur.de/cell-biology>

Berichtszeitraum:

1. Juni 2021 bis 31. Mai 2024



finanziert durch
Bayerisches Staatsministerium für
Umwelt und Verbraucherschutz



Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	2
Abkürzungsverzeichnis	3
1 Kurzzusammenfassung	4
2 Einführung	5
2.1 Hintergrund.....	5
2.2 Stand der Wissenschaft und Technik, eigene Vorarbeiten.....	5
3 Zielstellung	6
4 Ergebnisse und Diskussion	7
4.1 Analyse von Hitzestress auf Narbenfäden und Pollenschlauchwachstum von Mais.....	7
4.1.1 Experimentelles Setup.....	7
4.1.2 Analyse von Hitzestress auf Vitalität und Zelltod der Papillenhaarzellen.....	8
4.1.3 Analyse von Hitzestress auf das Einwachsen von Pollenschläuchen.....	9
4.1.4 Analyse des späten Pollenschlauchwachstums.....	10
4.1.5 Analyse der Spiegel an reaktiven Sauerstoffspezies (ROS).....	12
4.1.6 Analyse der Wirkung von Superoxid und H ₂ O ₂ -Scavenger.....	13
4.2 RNA-seq und bioinformatische Analysen.....	15
4.3 Anwendung von Sprüh-induziertem Gen-Silencing (SIGS) auf Narbenfäden von Mais.....	17
4.3.1 Anwendungen von siRNAs auf Narbenfäden von Mais.....	17
4.3.2 Aufnahme von dsRNAs und Transport in Narbenfäden.....	18
4.4 Erstellung eines Multi-omics-Atlas von Maiskeimlingen unter Kälte-, Hitze- und Trockenstress im Zeitverlauf.....	20
4.5 Projektfortschritt.....	23
5 Veröffentlichungen im Rahmen des Projekts	25
6 Vernetzungen	26
7 Bestehende und entstandene Industriebeteiligung/-en	26
8 Zusammenfassung	26
9 Ausblick	28
Literaturverzeichnis (*eigene Publikationen)	29
Anhang	31

Abkürzungsverzeichnis

- ACS: Ascorbinsäure
- AP: *after pollination*
- DAB: 3,3'-Diaminobenzidin
- DEG: differentiell exprimiertes Gen
- DEP: differentiell exprimiertes Protein
- DIC: Differentialinterferenzkontrast
- DPS: differentiell phosphorylierte Stellen
- dsRNA: doppelsträngige RNA
- FDA: Fluoresceindiacetat-Färbung
- GFP: grün fluoreszierendes Protein
- GO: *Gene Ontology*
- GRN: genregulatorisches Netzwerk
- HAP: *hours after pollination*
- H₂DCFDA: 2',7'-Dichlordihydrofluorescein-diacetat
- HS: Hitzestress
- KHTs: kurze Hochtemperaturepisoden
- NBT (Nitroblue-Tetrazolium)
- NS: *non-stressed*
- PCA: *Principle Component Analysis*
- PI: Propidiumiodid-Färbung.
- ROS: *Reactive Oxygen Species*
- RT-qPCR: quantitative reverse Transkriptions-PCR
- SIGS: sprüh-induziertes Gen-Silencing
- siRNA: *small interfering RNA* (Ribonukelinsäure)
- SNP: *single nucleotide polymorphism*
- SOD: Superoxiddismutase
- TF: Transkriptionsfaktor

1 Kurzzusammenfassung

In diesem Projekt sollte der Effekt von transientem Hitzestress auf die Keimung und das Wachstum von Pollenschläuchen in Narbenfäden von Mais untersucht werden. Aus Vorarbeiten war bekannt, dass transienter Hitzestress während der Bestäubung zu Sterilität und fehlendem Kornansatz führt. Im Forschungsvorhaben wurde zunächst gezeigt, dass transienter Hitzestress zu erhöhtem Zelltod und signifikant verminderter Zellvitalität und Plasmamembranintegrität der Papillenhaarzellen auf der Oberfläche der Narbenfäden führt. Dennoch hat dies keine signifikante Auswirkung auf die frühe Phase der Pollenkeimung und das Eindringen in Papillenhaarzellen und Transmissionsgewebe der Narbenfäden. Erst ein später Pollenschlaucharrest nach wenigen Zentimetern Wachstum führt zu Sterilität, da die Pollenschläuche die Samenanlagen nicht erreichen. Es wurde weiter gezeigt, dass die Menge an reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) in Narbenfäden nach Hitzestress deutlich ansteigt. Nach Sprühen mit sog. ROS-Fängern sinken die Mengen erheblich und die Sterilität konnte größtenteils aufgehoben werden. Molekulare Untersuchungen haben anschließend gezeigt, dass insbesondere Gene für Peroxidasen, die ROS abbauen, durch Hitzestress nahezu abgeschaltet werden. Darüber hinaus wurden Gene für Hitzestress-induzierte NAC-Transkriptionsfaktoren und für abgeschaltete bHLH-Transkriptionsfaktoren identifiziert. Ein im Rahmen des Projekts analysierter Multi-omics-Atlas (Transkriptomik, Proteomik und Phospho-Proteomik), bei dem die wichtigsten abiotischen Umweltstressoren (Kälte- und Hitzestress sowie Trockenheit) über 10 Tage bei Mais-Keimlingen untersucht wurden, hat insbesondere NAC-Gene als Schlüsselgene bei Umweltstress bestätigt. Experimente zum Sprüh-induziertem Gen-Silencing (SIGS) von Kandidatengenengenen zeigten, dass Narbengewebe für solche Ansätze geeignet ist, aber noch geeignete Formulierungen entwickelt werden müssen, um diese Ansätze effektiv anwenden zu können.

2 Einführung

2.1 Hintergrund

Insbesondere durch hohe CO₂-Emissionen der Industrieländer und Abholzung tropischer Regenwälder hat sich das Klima weltweit stark verändert. Umwelt- und Naturkatastrophen z.B. durch Dürreperioden, Überflutungen und Stürme haben signifikant zugenommen. Die globale Erderwärmung hat hierbei auch einen großen Einfluss auf die Welternährung, da Trockenheit und Hitze die beiden abiotischen Hauptfaktoren darstellen, die einen stark limitierenden Einfluss auf den Ertrag von Nutzpflanzen haben. Insbesondere Hitzestress beeinträchtigt hierbei die Samenbildung und somit die Fortpflanzung und den Ertrag von Pflanzen [1-4]. Während Hitzestress in der vegetativen Wachstumsphase u.a. zu vorübergehendem Wachstumsarrest, Defekten bei der Photosynthese und der Photorespiration führt, sind diese Defekte meistens reversibel und haben i.d.R. im Vergleich zu Hitze- und Trockenstress während der Reproduktionsphase weniger Einfluss auf den Ertrag. So wurde z.B. für kommerzielle Weizenlinien gezeigt, dass kurze Hochtemperaturepisoden (KHTs) für nur 1–2 Tage bei 35°C oder 3–5 Tage bei >30°C während der Reproduktionsphase bereits zu Ertragsverlusten von bis zu 50% führen können [5, 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 deutlich zunehmen. Die Verbesserung der Hitzetoleranz ist daher weltweit ein primäres Züchtungsziel [7]. Neben Hitzetoleranz sind andere abiotische Stressfaktoren wie Trockenheit und Kälte wichtige limitierende Faktoren, die die Pflanzenproduktion sowohl qualitativ als auch quantitativ stark beeinträchtigen [8-11].

2.2 Stand der Wissenschaft und Technik, eigene Vorarbeiten

Morphologische und molekulare Untersuchungen haben gezeigt, dass KHTs insbesondere während der ersten Pollenbildungsphasen (Meiose- und Tetradenstadium) kritisch für den Samenansatz sind und zu signifikanten Ertragsverlusten bei Getreide führen können. So konnten wir für Mais zeigen, dass anschließend u.a. die Pollenkeimfähigkeit stark reduziert und der Transport von Spermazellen in Pollenschläuche defekt ist [12, 13]. Bisher kaum untersucht ist der Einfluss von KHTs auf die Entwicklung der weiblichen Reproduktionsorgane und Gameten, der Empfänglichkeit der weiblichen Narbe für Pollenkörner, das Pollenschlauchwachstum im Griffel und Fruchtknoten sowie während der Befruchtung. Die meisten dieser Prozesse finden eingebettet in mehrere Hüllblätter statt, die bei Hitzestress für Transpirationskühlung sorgen können [14]. Jedoch findet die Pollenkeimung auf der Blütennarbe und das Einwachsen in das Griffelgewebe ohne Transpirationskühlung statt und ist Hitzestress somit besonders ausgesetzt. Gespräche mit bayerischen Pflanzenzüchtern und Landwirten haben vermuten lassen – ohne dass dies wissenschaftlich bisher untersucht wurde –, dass diese Prozesse bei vielen Nutzpflanzen sogar besonders limitierende Faktoren beim Ertrag in Hitzestressperioden darstellen könnten. In Vorarbeiten mit Mais konnten wir diese Annahme bestätigen (Abbildung 1).

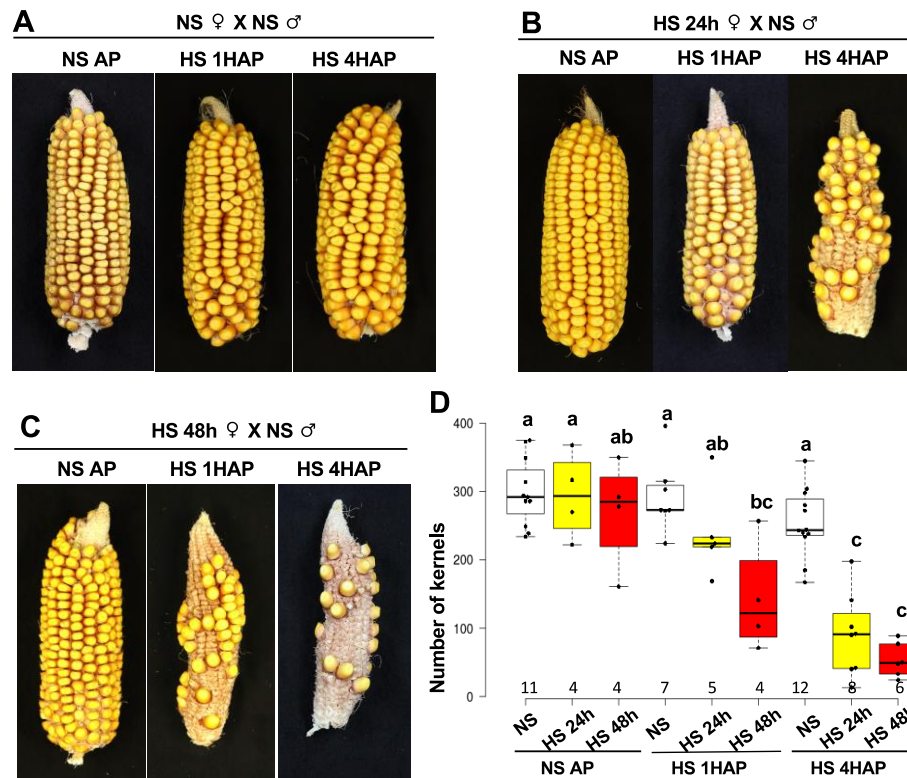


Abbildung 1: Hitzestress (HS) während des Pollenschlauchwachstums im Narbengewebe führt zu einer Verringerung des Samenansatzes bei Mais. **A.-C.** Die Kolben wurden etwa einen Monat nach den angegebenen Kreuzungen geerntet. Repräsentative Beispiele von Kolben aus Kreuzungen von Narbenfäden unter Kontrollbedingungen (A) und für 24 Stunden (B) sowie 48 Stunden HS (C) mit nicht gestresstem Pollen sind dargestellt. Nach der Bestäubung wurden die Pflanzen für weitere 1h HS (HS 1HAP) bzw. 4h HS (HS 4HAP) ausgesetzt oder direkt in Kontrollbedingungen ohne Hitzestress überführt (NS AP). **D.** Quantifizierung der Kornzahlen aus den angegebenen Kreuzungen.

Darüber hinaus gibt es bereits zahlreiche Studien über abiotischen Stress bei Nutzpflanzen, aber bisher nur wenige, die über einen langen Zeitraum hinweg auf Multi-omics-Basis durchgeführt wurden. Unser Ziel war es daher zusätzlich den ersten hochgradig reproduzierbaren Transkriptom-Atlas von Maispflanzen unter verschiedenen Umweltbedingungen und im Zeitverlauf zu erstellen.

3 Zielstellung

Ziel des Forschungsvorhabens war es daher, bei einer der für Bayern wichtigsten Nutzpflanzen (Mais) in drei Arbeitspaketen folgende Untersuchungen durchzuführen:

- 1.) *Arbeitspaket #1:* mit physiologischen Methoden sollte untersucht werden, wie Narbenfäden (diese entsprechen funktionell der Narbe der meisten Blütenpflanzen und sind durch ihre Länge besonders gut für die geplanten Studien geeignet) auf Hitzestress reagieren und ob es Pollenschläuchen möglich ist, bei Hitzestress in die Narbenfäden einzudringen. U.a. sollen die Bildung von ROS (*Reactive Oxygen Species*),

der Wasserverlust, die Vitalität und der Zelltod gemessen sowie das Pollenschlauchwachstum verfolgt und der Kornansatz bestimmt werden.

- 2.) *Arbeitspaket #2*: um die molekularen Mechanismen von Hitzestress auf Narbenfäden und eindringende Pollenschläuche zu verstehen und Gene für weiterführende Analysen zu selektieren, sollten anhand der Ergebnisse aus Arbeitspaket #1 Hitzestressregime erstellt, Proben gesammelt und RNA-seq Analysen durchgeführt werden. Anschließend sollten Kandidatengene identifiziert werden. Um die vielversprechendsten Gene zu identifizieren, wurde zusätzlich die Analyse von zur Verfügung gestellten RNA-seq- und Proteom-Daten von Maispflanzen, die Hitze-, Trocken- und Kältestress ausgesetzt wurden, neu in Arbeitspaket #2 aufgenommen. Hierbei wurden Maiskeimlinge der Sorte B73 über einen Zeitraum von zehn Tagen drei großen abiotischen Stressfaktoren (Kälte, Hitze und Trockenheit) ausgesetzt und jeweils das vierte Blatt für die RNA-seq-Analyse ausgewählt, um gewebespezifische Effekte zu vermeiden und eine hochreproduzierbare Datenbank sowie eine Webschnittstelle für die Forschungsgemeinschaft zu erstellen.
- 3.) *Arbeitspaket #3*: es sollten parallel experimentelle Bedingungen getestet werden, um zunächst als Pilotprojekt die ROS bzw. GFP-Bildung in Narbenfäden nach Besprühen mit spezifischen siRNAs zu unterdrücken. Die Aufnahme der siRNAs sollte untersucht und für Narbenfäden optimiert werden. Anschließend sollte dieses System genutzt werden, um im Verlauf des Vorhabens selektierte Gene mit dieser Methode abzuschalten.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Analyse von Hitzestress auf Narbenfäden und Pollenschlauchwachstum von Mais

4.1.1 Experimentelles Setup

Um die Auswirkung von Hitzestress auf die Fruchtbarkeit des weiblichen Gametophyten von Mais zu untersuchen, setzten wir die Pflanzen, die die weiblichen Blüten (Kolben) trugen, über verschiedene Zeiträume von 4 bis 48 Stunden mäßigem Hitzestress (35°C/25°C; Tag/Nacht) aus, während die Pflanzen, die die männlichen Blüten trugen, unter Kontrollbedingungen (28°C/22°C) angebaut wurden. Nach der Bestäubung wurde eine fortgesetzte Hitzestressperiode von bis zu 4 Stunden angewendet. Wir analysierten den Samenansatz, die Pollenkeimung im Narbengewebe, die Veränderungen der Zellvitalität, die Membranintegrität sowie die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) (s.u.), um einen umfassenden Überblick über die Auswirkungen von Hitzestress auf die Fertilität und das Pollenschlauchwachstum in Hitze-gestressten Narbenfäden zu bekommen.

4.1.2 Analyse von Hitzestress auf Vitalität und Zelltod der Papillenhaarzellen

Zunächst untersuchten wir die Auswirkungen von Hitzestress auf die Zellvitalität und den Zelltod von Papillenhaarzellen von Mais mittels Fluoresceindiacetat- (FDA) und Propidiumjodid- (PI) Färbung. Vor dem Hitzestress zeigten 98,5% (n=66) der Haarzellen keinen Zelltod mit PI-Färbung und alle Zellen waren positiv mit FDA-Färbung. 1,5 % der Haarzellen wiesen abgestorbene Zellen mit PI-Färbung und eine verminderte Zellvitalität mit verminderter FDA-Färbung auf (Abbildung 2A). Der Prozentsatz des Zelltods und der verringerten Zellvitalität stieg nach 12 Stunden Hitzestress auf 33,8 % (n=80) und weiter auf 62,1 % (n=103) bzw. 65,2 % (n=69) nach 24 bzw. 48 Stunden (Abbildung 2B, 2C). Der Prozentsatz des Absterbens der Haarzellen nahm mit der Dauer des Hitzestresses von 4 bis 48 Stunden zu. Bei einer Hitzestressdauer von mehr als 24 Stunden war die Rate des Zelltods signifikant höher als bei einer Dauer von 4 bis 12 Stunden. Zwischen 24h und 48h Hitzestress gab es jedoch keinen signifikanten Unterschied in der Zelltodrate (Abbildung 2D). Insgesamt führt moderater Hitzestress zu erhöhtem Zelltod und signifikant verminderter Zellvitalität der Haarzellen.

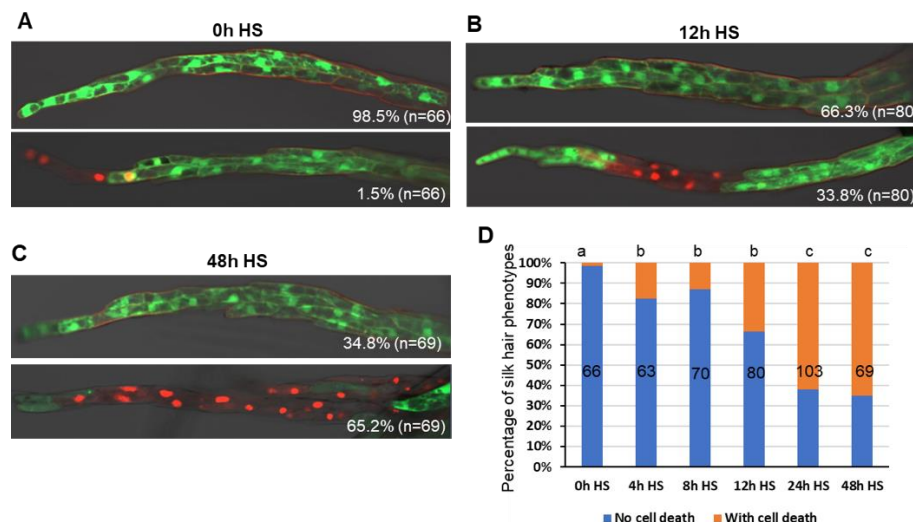


Abbildung 2: Moderater Hitzestress führt zum Zelltod und einer verminderten Zellvitalität der Haarzellen. **A.-C.** Konfokale Mikroskopie von Papillenhaaren gefärbt mit Fluoresceindiacetat (FDA, grün) und Gegenfärbung mit Propidiumjodid (PI, rot). Die Haarzellen waren 0h (A), 12h (B) und 48h (C) unter Hitzestress. **D.** Prozentsatz der Haare mit Zelltod (PI-Färbung im Zellkern).

Um die Auswirkungen von Hitzestress auf die Narbenfäden weiter zu bestätigen, analysierten wir die Integrität der Plasmamembran durch Evans-Blau-Färbung, die auch als Marker für die Zellvitalität verwendet wird. Vor dem Hitzestress zeigten 89,6 % (n=67) der Haarzellen keine Evans-Blau-Färbung, während die anderen 10,4 % eine Färbung in einigen wenigen Zellen an der Spitze der Papillenhaare zeigten (Abbildung 3A). Nach 12 Stunden Hitzestress zeigten 45,6 % (n=79) der Papillenhaare Evans-Blau-Färbung in den Haarzellen (Abbildung 3B). Der Prozentsatz der Papillenhaare mit Evans-Blau-Färbung stieg nach 24 Stunden Hitzestress weiter auf 63,2 % an (Abbildung 3C). Der Prozentsatz der Haarzellen mit erhöhter Plasmamembranintegrität nahm mit der Dauer des Hitzestresses von 4 Stunden bis 48 Stunden zu. Bei einer Hitzestressdauer von mehr als 24 Stunden war die Zelltodrate signifikant höher als bei einer Dauer von 4 bis 12 Stunden. Zwischen 24 und 48 Stunden Hitzestress

gab es jedoch keinen signifikanten Unterschied in der Zelltodrate (Abbildung 3D), was mit dem Zelltod und der Zellvitalität übereinstimmt, die durch PI- und FDA-Färbung angezeigt wurden. Insgesamt führt moderater Hitzestress zu einer verminderten Plasmamembranintegrität und einer geringeren Zellvitalität der Papillenhaare der Narbenfäden.

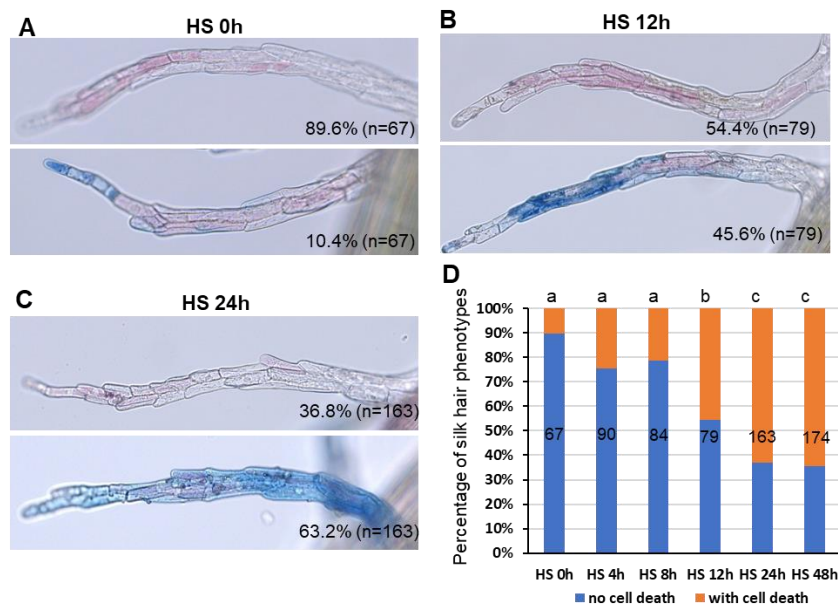


Abbildung 3: Moderater Hitzestress führt zu einer verminderten Plasmamembranintegrität der Papillenhaare. **A.-C.** Evans-Blau gefärbte Papillenhaare. Die Narbenfäden wurden 0 Stunden (A), 12 Stunden (B) und 24 Stunden (C) lang Hitzestress ausgesetzt. **D.** Prozentsatz der Papillenhaare mit vermindelter Plasmamembranintegrität (Evans-Blau-Färbung in der Zelle).

4.1.3 Analyse von Hitzestress auf das Einwachsen von Pollenschläuchen

Die Keimung, das Wachstum und das Eindringen der Pollenschläuche in Papillenhaaren ist ein mehrstufiger Prozess, der eine komplexe Interaktion zwischen dem männlichen Gametophyten sowie dem sporophytischen Gewebe und dem weiblichen Gametophyten einschließt [14] und auch für die Befruchtung der Maispflanze wesentlich ist. Um die Auswirkung von Hitzestress auf die Keimung, das Wachstum und das Eindringen der Pollenschläuche in Papillenhaaren *in vivo* zu analysieren, wurde die Anilinblaufärbung verwendet. In Kontrollbedingungen wurden nicht gestresste (NS) Narbenfäden mit nicht gestressten (NS) Pollen bestäubt. Das Wachstum der Pollenschläuche wurde 1 Stunde nach der Bestäubung (1 HAP) und 4 Stunden nach der Bestäubung (4 HAP) beobachtet. Hierbei wurde festgestellt, dass mehrere Pollenschläuche in beide Transmissionsgewebe der Narbenfäden erfolgreich eindringen (Abbildung 4A). Das Wachstum der Pollenschläuche in das Transmissionsgewebe wurde auch in Narbenfäden nach 12h, 24h und 48h Hitzestress beobachtet (mit 1h und 4h kontinuierlichem Hitzestress nach der Bestäubung) (Abbildung 4B-D), wobei mehrere Pollenschläuche in beide Transmissionsgewebe eindrangen, deren Anzahl im Vergleich zur NS-Bedingung aber etwas geringer war. Dies deutet darauf hin, dass mäßiger Hitzestress keine signifikante Auswirkung auf die frühe Phase der Pollenkeimung trotz oben beschriebenen Absterbens eines Teils der Papillenhaarzellen an der Narbenfadenoberfläche hat.

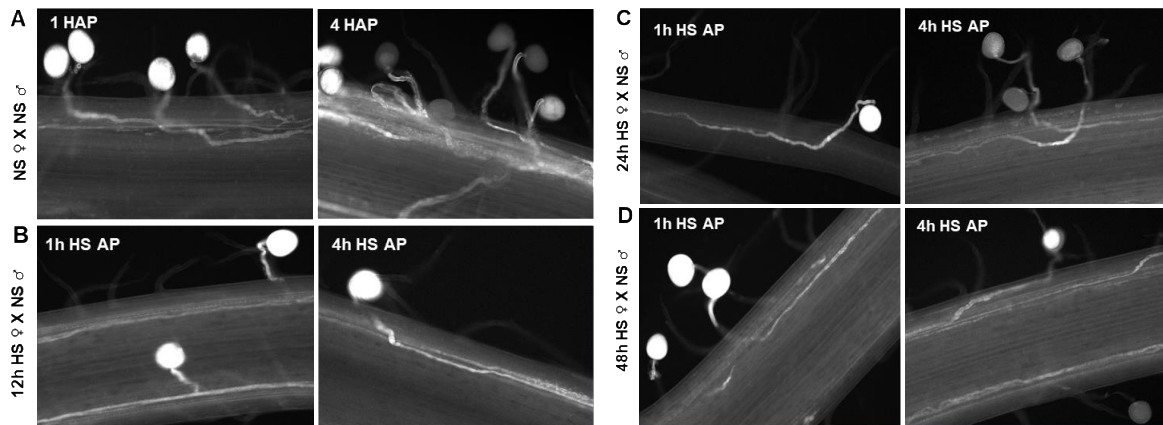


Abbildung 4: Das frühe Wachstum des Pollenschlauchs wird durch Hitzestress nicht beeinträchtigt. **A.-D.** Anilinblau-gefärbte bestäubte Narbenfäden. (A) Nicht gestresste (NS) Narbenfäden wurden mit nicht gestresstem (NS) Pollen bestäubt. 1 Stunde nach der Bestäubung (1 HAP) und 4 Stunden nach der Bestäubung (4 HAP). (B-D) Das Wachstum der Pollenschläuche in die Übertragungswege wurde in den Nabenfäden nach 12 Stunden (B), 24 Stunden (C) und 48 Stunden (D) Hitzestress (HS) beobachtet, die mit NS-Pollen bestäubt und kontinuierlich mit 1 Stunde (links) und 4 Stunden (rechts) Hitzestress nach der Bestäubung (AP) behandelt wurden.

4.1.4 Analyse des späten Pollenschlauchwachstums

Nach dem frühen Wachstum und dem Eindringen in das Transmissionsgewebe wächst der Pollenschlauch weiter zur Samenanlage. Dann wird er durch die Mikropyle in den weiblichen Gametophyten geleitet. Daher haben wir anschließend die Auswirkungen von Hitzestress auf das späte Wachstum des Pollenschlauchs untersucht. 24 Stunden nach der Bestäubung (HAP) konnte der Pollenschlauch unter Kontrollbedingungen erfolgreich in die Samenanlage wachsen (Abbildung 5A). Dies war auch der Fall, wenn die Narbenfäden 24 Stunden vor der Bestäubung Hitzestress ausgesetzt waren und nach der Bestäubung bei Kontrolltemperatur weiter gehalten wurden. Im Vergleich dazu zeigten 38,5 % (n=13) der Narbenfäden unter 24 Stunden Hitzestress vor der Bestäubung und 4 Stunden Hitzestress nach der Bestäubung kein Pollenschlauchwachstum in der proximalen Region nach 24 HAP (Abbildung 5B). Bei 15,6 % (n=18) der Seiden, die vor der Bestäubung 48 Stunden Hitzestress ausgesetzt waren und nach der Bestäubung bei Kontrolltemperatur standen, wuchs auch nach weiteren 24 HAP kein Pollenschlauch durch den proximalen Bereich. Jedoch zeigten 57,1 % (n=14) der Seiden unter 48 Stunden Hitzestress vor der Bestäubung und 4 Stunden Hitzestress nach der Bestäubung kein Pollenschlauchwachstum im proximalen Bereich (Abbildung 5C), und bei 27 HAP und 30 HAP zeigten immer noch 42,8 % (n=14) Nabenfäden keine Spur von Pollenschlauchwachstum, was darauf hindeutet, dass die Narbenfäden unter Hitzestress vor und nach der Bestäubung einen späten Wachstumsstopp des Pollenschlauchs verursachen.

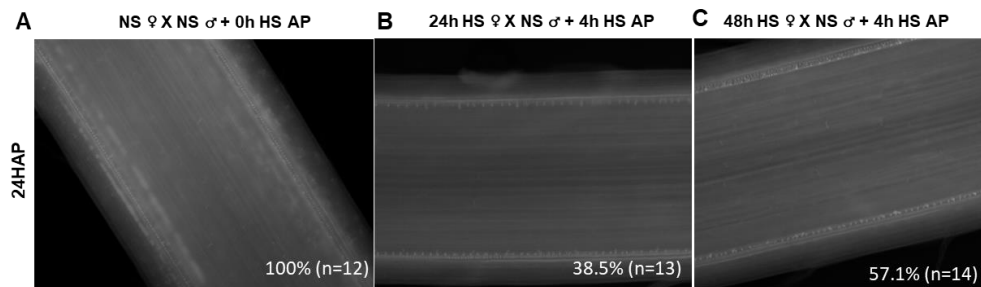


Abbildung 5: Spätes Wachstum des Pollenschlauchs im Narbenfaden wird nach kurzer Zeit Hitzestress gestoppt. **A.-C.** Anilinblau-Färbung des 1 bis 2 cm langen proximalen Bereichs (Abszissionszone) der Narbenfäden 24 Stunden nach der Bestäubung (HAP). Fäden bei Nichtstress-Temperatur (NS) vor und nach der Bestäubung (A), mit 24 Stunden Hitzestress (HS) vor und 4 Stunden nach der Bestäubung (B), mit 48 Stunden HS vor und 4 Stunden nach Bestäubung (C).

Um einen besseren Einblick in die Fruchtbarkeit zu erhalten, untersuchten wir anschließend das Einwachsen des Pollenschlauches in die Samenanlage (Abbildung 6). Bei 24 HAP zeigte die Anilinblau-Färbung, dass Pollenschläuche in den weiblichen Gametophyten eingedrungen waren. Keine der beobachteten Samenanlagen wies jedoch Pollenschläuche bei 24 Stunden HS vor/4 Stunden HS nach der Bestäubung bzw. 48 Stunden HS vor/4 Stunden HS nach der Bestäubung auf.

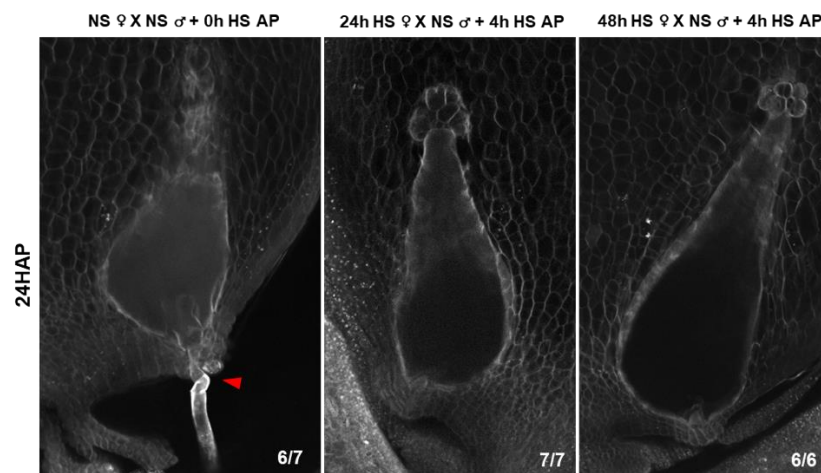


Abbildung 6: Das mikropylare Wachstum des Pollenschlauches in den weiblichen Gametophyten wird durch Hitzestress beeinträchtigt. Anilinblaufärbung von Schnitten der Samenanlage, die den weiblichen Gametophyten enthält (24 HAP). Kontrollbedingungen (links), 24h HS vor und 4h HS nach der Bestäubung (Mitte), 48h HS vor und 4h HS nach der Bestäubung (rechts). Die rote Pfeilspitze zeigt den Pollenschlauch in der Mikropylarregion.

Insgesamt lässt sich daher zusammenfassen, dass Pollenschläuche trotz einer hohen Zelltodrate in Papillenhaarzellen in die Narbenfäden und das Transmissionsgewebe eindringen und mehrere Zentimeter wachsen, bevor es zu einem späten Pollenschlaucharrest in Narbenfäden kommt und die Embryosäcke so nicht mehr erreicht werden. Dadurch kann keine Befruchtung stattfinden und es kommt zu einem erheblich verminderten Kornansatz.

4.1.5 Analyse der Spiegel an reaktiven Sauerstoffspezies (ROS)

Es ist bekannt, dass reaktive Sauerstoffspezies (ROS) bei hohen Konzentrationen Zelltodprogramme auslösen, während moderate ROS-Konzentrationen eine entscheidende Rolle bei der Signalwahrnehmung und -übertragung spielen, insbesondere bei Umweltstressreaktionen und der Fortpflanzung in Pflanzen [15-17]. Über die Rolle von ROS während der Reproduktion bei Mais ist weniger bekannt. Ein kürzlich veröffentlichter Bericht zeigte, dass hohe ROS-Konzentration die DNA von Spermazellen in Pollen schädigt [18], während eine übermäßige Anhäufung von ROS während der frühen Kornentwicklung zu schweren Schäden an Nucellus- und Endospermzellen führt [19]. Um die Auswirkung von HS auf den ROS-Gehalt in den Narbenfäden sichtbar zu machen, wurde zunächst eine allgemeine ROS-Nachweissonde (H_2DCFDA) verwendet, die fluoresziert, wenn in einer Zelle eine Oxidation stattfindet. Schwache Fluoreszenzsignale konnten in den Papillenhaaren, aber kaum im Inneren der Narbenfäden ohne HS nachgewiesen werden (Abbildung 7A).

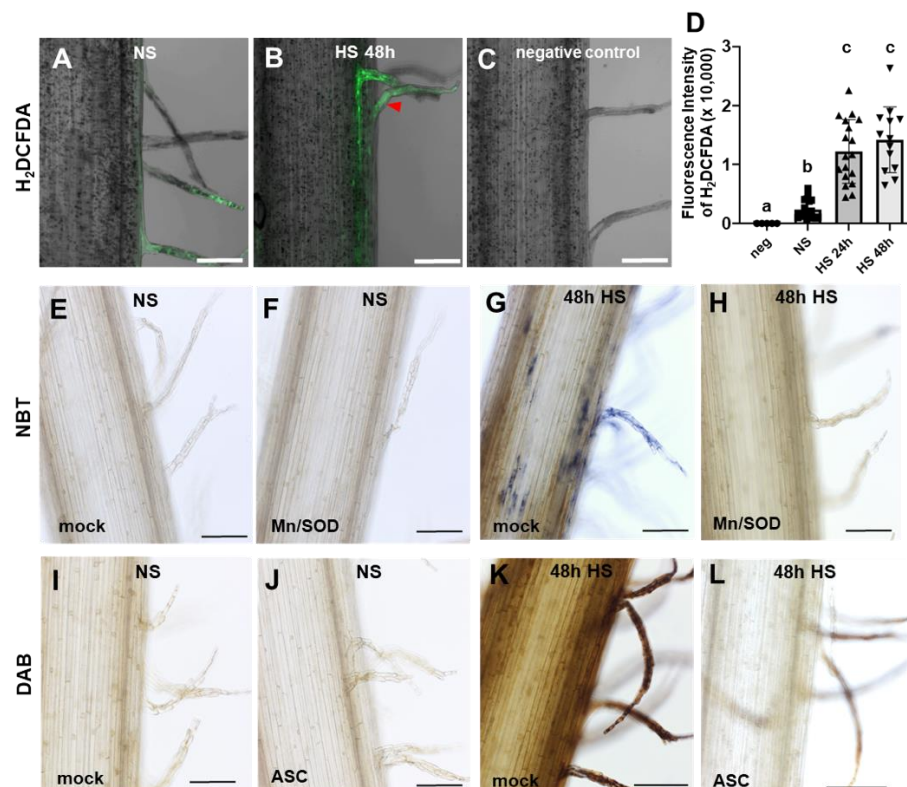


Abbildung 7: Der ROS-Gehalt steigt in Narbenfäden von Mais unter Hitzestress (HS) deutlich an, und ROS-Scavenger sind in der Lage den Gehalt zu reduzieren. **A.-C.** Narbenfäden, die mit H_2DCFDA -Fluoreszenzsonden unter NS-Bedingungen (A) und nach 48 Stunden HS (HS 48h) (B) behandelt wurden. Nicht gestresste Narbenfäden ohne Sonde wurden als Negativkontrolle verwendet (C). **D.** Quantifizierung der relativen Fluoreszenzintensität von Narbenfäden mit einer H_2DCFDA -Sonde. **E.-H.** Nitroblau-Tetrazolium (NBT) gefärbte Narbenfäden, die während der HS-Behandlung mit Mock-Lösung (E, G) oder mit $MnCl_2$ und SOD-Lösung (F, H) besprüht wurden. Die Narbenfäden wurden unter NS-Bedingungen (E, F) oder unter HS für 48 Stunden (HS 48h) gehalten (G, H). **I.-L.** 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) gefärbte Narbenfäden, die während der HS-Behandlung mit Mock-Lösung (I, K) oder mit Ascorbinsäure (ASC)-Lösung (J, L) besprüht wurden. Die Narbenfäden wurden unter NS-Bedingungen (I, J) oder unter HS für 48 Stunden (K, L) gehalten. Skalensbalken: 100 μm .

Das Fluoreszenzsignal nahm jedoch sowohl in den Papillenhaaren als auch in den Narbenfäden nach 24 h und 48 h HS-Exposition deutlich zu. Die stärksten Signale wurden in der epidermalen Zellschicht der Narbenfäden und der Papillenhaare beobachtet (Abbildung 7B, 7D). Ein signifikanter Unterschied in der Intensität der Fluoreszenzsignale zwischen 24 h und 48 h HS-Exposition konnte nicht beobachtet werden (Abbildung 7D). Dies deutet darauf hin, dass der ROS-Gehalt in den Narbenfäden während der HS-Exposition deutlich ansteigt.

Um die Rolle der durch HS verursachten erhöhten ROS-Konzentrationen während der Befruchtung sichtbar zu machen und zu quantifizieren, haben wir die Narbenfäden mit ROS-Scavengern (ROS-Fängern) besprüht, um die ROS-Konzentrationen zu reduzieren. MnCl₂ (Mn) zusammen mit Superoxiddismutase (SOD) ist ein Fänger für O₂^{-•}. Wie in Abbildung 7E-H zu sehen ist, ging die NBT-Färbung in Narbenfäden und Papillenhaaren, die mit einer Mn/SOD-Lösung unter HS besprüht wurden, im Vergleich zur Versuchskontrolle (Wasser) deutlich zurück. Im Gegensatz zur Versuchskontrolle nahm die DAB-Färbung nach dem ASC-Sprühen in Narbenfäden und der Papillenhaaren, die kontinuierlich HS ausgesetzt waren, ebenfalls signifikant ab (Abbildung 7I-L). Diese Experimente zeigen, dass die Superoxid-Scavenger SOD und H₂O₂-Scavenger ASC die durch HS verursachten ROS-Konzentrationen in den Narbenfäden deutlich reduzieren können.

4.1.6 Analyse der Wirkung von Superoxid und H₂O₂-Scavenger

Als Nächstes gingen wir der Frage nach, ob der durch HS induzierte späte Wachstumsstillstand der Pollenschläuche durch erhöhte ROS-Werte verursacht wird. Wir besprühten Narbenfäden, die 48 Stunden lang HS ausgesetzt waren, mit den H₂O₂- und O₂^{-•}-Fängern ASC bzw. Mn/SOD und den entsprechenden Kontrollen. Keine der Sprühbehandlungen beeinflusste die Pollenkeimung und das frühe Wachstum der Pollenschläuche (Abbildung 8A-D). Sowohl ASC als auch Mn/SOD stellten jedoch den späten Wachstumsstillstand der Pollenschläuche teilweise wieder her, da die Anzahl der Pollenschläuche im proximalen Bereich der Seide von 50 % auf 61 % bzw. auf 69 % anstieg (Abbildung 8E-H, Abbildung 8K). NS-Seiden (die 48 Stunden lang mit der Scheinkontrolle besprüht wurden), die von NS-Pollen bestäubt und 4 Stunden lang HS ausgesetzt wurden, zeigten eine normale (93 %) Keimung und ein normales Wachstum der Pollenschläuche (Abbildung 8I-J). Zusammengefasst reduzieren Superoxid- und H₂O₂-Fänger den durch HS verursachten ROS-Gehalt in den Narbenfäden und ermöglichen es den Pollenschläuchen so über längere Strecken zu wachsen. Des Weiteren analysierten wir den Samenansatz von Maiskolben, die nach einer 48-stündigen HS-Exposition geerntet wurden, nachdem sie mit Mock, ASC bzw. Mn/SOD besprüht worden waren. Kolben, die mit ASC und insbesondere mit Mn/SOD besprüht wurden, stellten den Samenansatz und damit den Ertrag im Vergleich zu den mit Mock behandelten Kolben deutlich wieder her (Abbildung 8L-M). Dies deutet darauf hin, dass die Verringerung der HS-induzierten ROS-Konzentration in den Narbenfäden die Fruchtbarkeit deutlich verbessert.

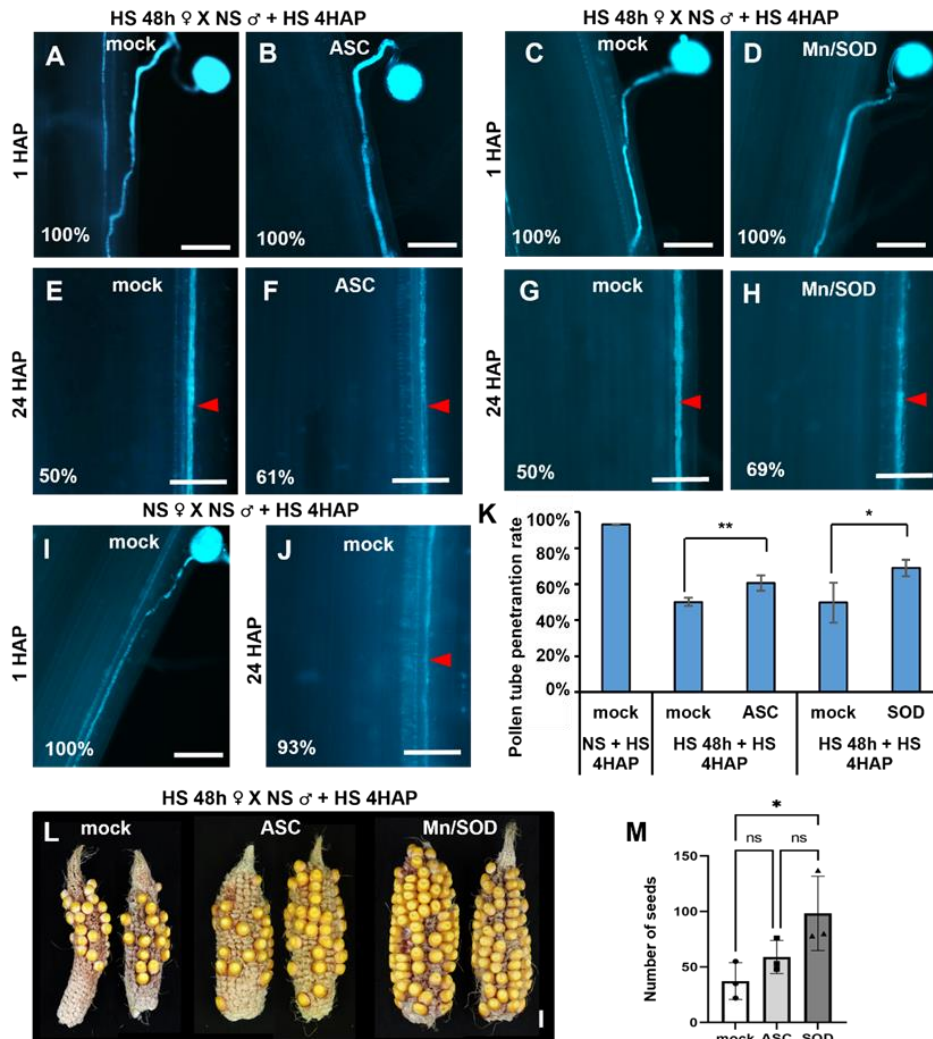


Abbildung 8: ROS-Scavenger heilen durch Hitzestress verursachte Wachstumsdefekte und Sterilität der Pollenschläuche. **A.-J.** Fluoreszenzmikroskopie von mit Anilinblau gefärbten bestäubten Narbenfäden unter den angegebenen Stressbedingungen und der Behandlung mit sog. ROS-Fängern. Die Prozentsätze der beobachteten Phänotypen sind angegeben. (A-D) Narbenfäden wurden mit 48 Stunden HS (HS 48h) behandelt und dann mit NS-Pollen bestäubt. Das frühe Wachstum der Pollenschläuche im Übertragungstrakt wurde 1 Stunde nach der Bestäubung (1 HAP) beobachtet. (E-H) Die 1 bis 2 cm lange proximale Region (Abszissionszone) der Narbenfäden wurde 24 Stunden nach Bestäubung (24 HAP) auf spätes Wachstum der Pollenschläuche untersucht. Mock- und Ascorbinsäure (ASC)-Lösung wurden während der HS-Behandlungen auf die Narbenfäden gesprüht (A, B, E, F). Mock-Lösung und MnCl₂ mit SOD-Lösung wurden während der HS-Behandlung auf die Narbenfäden gesprüht (C, D, G, H). (I-J) NS- Narbenfäden, die mit NS-Pollen bestäubt und mit Mock-Lösung besprüht wurden, dienten als positive Kontrolle für das Pollenschlauchwachstum bei 1 HAP (I) und 24 HAP (J). Skalenbalken: 100 µm. **K.** Der Prozentsatz der Narbenfäden mit Pollenschlauchwachstum in der proximalen Region wurde nach 24 HAP quantifiziert. **L.** Gerechtete Kolben aus den angegebenen Behandlungen. Repräsentative Beispiele von Kolben nach Besprühen mit Mock-, ASC- und MnCl₂/SOD-Lösung während der Hitzestressbehandlung. Maßstabsleiste: 1 cm. **M.** Quantifizierung der Anzahl der Körner (Samen) bei den angegebenen Behandlungen. ns: kein signifikanter Unterschied.

4.2 RNA-seq und bioinformatische Analysen

Um die molekularen Mechanismen von Hitzestress auf Narbenfäden aufzuklären, haben wir basierend auf den Ergebnissen aus Arbeitspaket #1 RNA-seq an der Inzucht-Maislinie B73 durchgeführt, wobei die Pflanzen 48 Stunden lang Hitzestress (35 °C/ 25 °C) ausgesetzt waren, bevor Proben gesammelt wurden. Da wir mit der Linie B73 sehr gute Ergebnisse erzielt haben und diese sehr sensitiv auf Hitzestress reagiert, haben wir die sog. MAGIC-Population nicht wie ursprünglich geplant in die Untersuchungen und Probensammlung eingeschlossen. Hierdurch konnte auch die Anzahl der Proben deutlich reduziert werden, die durch die enorm gestiegenen Personalkosten während der Projektlaufzeit auch nicht mehr hätten finanziert werden können.

Bei den pollinierten Proben ergab sich das Problem zwischen Hitzestresseffekten in Narbenfäden und solchen in Pollenschläuchen unterscheiden zu können. Daher haben wir die Inzuchtlinie Mo17 verwendet, bei der sich die meisten Gene durch SNPs (*single nucleotide polymorphisms*) von denen von B73 unterscheiden [20, 21]. In vorhergehenden Analysen hat sich gezeigt, dass Pollenschläuche in Narbenfäden nach etwa 4h das Wachstum einstellen. Daher haben wir diesen Zeitpunkt zur Untersuchung mit einbezogen. Alle Proben wurden für die Sequenzierung geerntet und sog. Libraries hergestellt. Aus 18 Proben (Tabelle 1 im Anhang) wurden ca. 150 GB Daten mit insgesamt 420 Millionen Reads generiert. Im Durchschnitt wurden aus jeder Probe 23 Millionen Reads erzeugt. Die Reads wurden auf das Mais-Referenzgenom (Ref_Gen4) gemappt, welches von MaizeGDB (www.maizrgdb.org) heruntergeladen wurde. Es wurde eine durchschnittliche Mapping-Rate von 90% erhalten. Das normalisierte Transkriptionsniveau wurde als Transkript pro Million (TPM) berechnet. Im Durchschnitt wurden in jeder Probe etwa 25.000 exprimierte Gene nachgewiesen.

Anschließend identifizierten wir differentiell exprimierte Gene. Es wurden 844 hochregulierte und 3.136 herunterregulierte Gene nach HS in Narbenfäden entdeckt. Die sog. GO-Anreicherungsanalyse für herunterregulierte DEGs zeigt, dass Wasserstoffperoxid-abbauende Prozesse angereichert sind, was mit den erhöhten ROS-Werten übereinstimmt, die während der Hitzestressreaktionen festgestellt wurden (Abbildung 9A, 9B). Zwei unter NS-Bedingungen hoch exprimierte Peroxidase (POD)-Gene *POD12* und *POD18* werden unter HS stark herunterreguliert (Abbildung 9C). Insgesamt konnten wir in unseren Proben 35 exprimierte *POD*-Gene nachweisen, von denen 27 *POD*-Gene in HS-behandelten Narbenfäden signifikant herabreguliert sind (Abbildung 9B). Die Verringerung der Peroxidaseaktivität kann den oben beschriebenen Anstieg der ROS-Werte während der HS erklären.

Schließlich analysierten wir die Expression von Transkriptionsfaktor (TF)-Genen im Narbengewebe nach HS-Exposition. TFs wie Hitzeschockfaktoren (HSFs), WRKYs, MYBs, NACs, bZIPs, AP2/ERFs, DREBs und bHLHs spielen eine wichtige Rolle bei der Regulierung der Genexpression mehrerer Gene als Reaktion auf Stressbedingungen [22-24]. Studien zur Anreicherung von TF-Familien zeigten, dass zusätzlich zu den Genen, die für HSFs kodieren, Gene für MYB-, ERF-, NAC-, WRKY-, MYB-verwandte, HD-ZIP-, ARF-, AP2- und bHLH-Transkriptionsfaktor-Familien nach HS differentiell exprimiert werden (Abbildung 9D). Bemerkenswert ist, dass viele *bHLH*-Gene zu den am stärksten herunterregulierten Genen gehören. Unter ihnen sind *bHLH116*, *bHLH57*, *bHLH150* und *bHLH121* besonders stark herunterreguliert, während eine Reihe von *NAC*-Genen (vier der 13 am stärksten hochregulierten TF-

Gene), darunter NAC44 und NAC122, zu den am stärksten hochregulierten DEGs gehören (Abbildung 9E). Dieser Befund deutet darauf hin, dass Mitglieder derselben TF-Familie koordiniert an HS-Reaktionen beteiligt sind, die Genregulatoren jedoch teilweise in entgegengesetzter Richtung wirken.

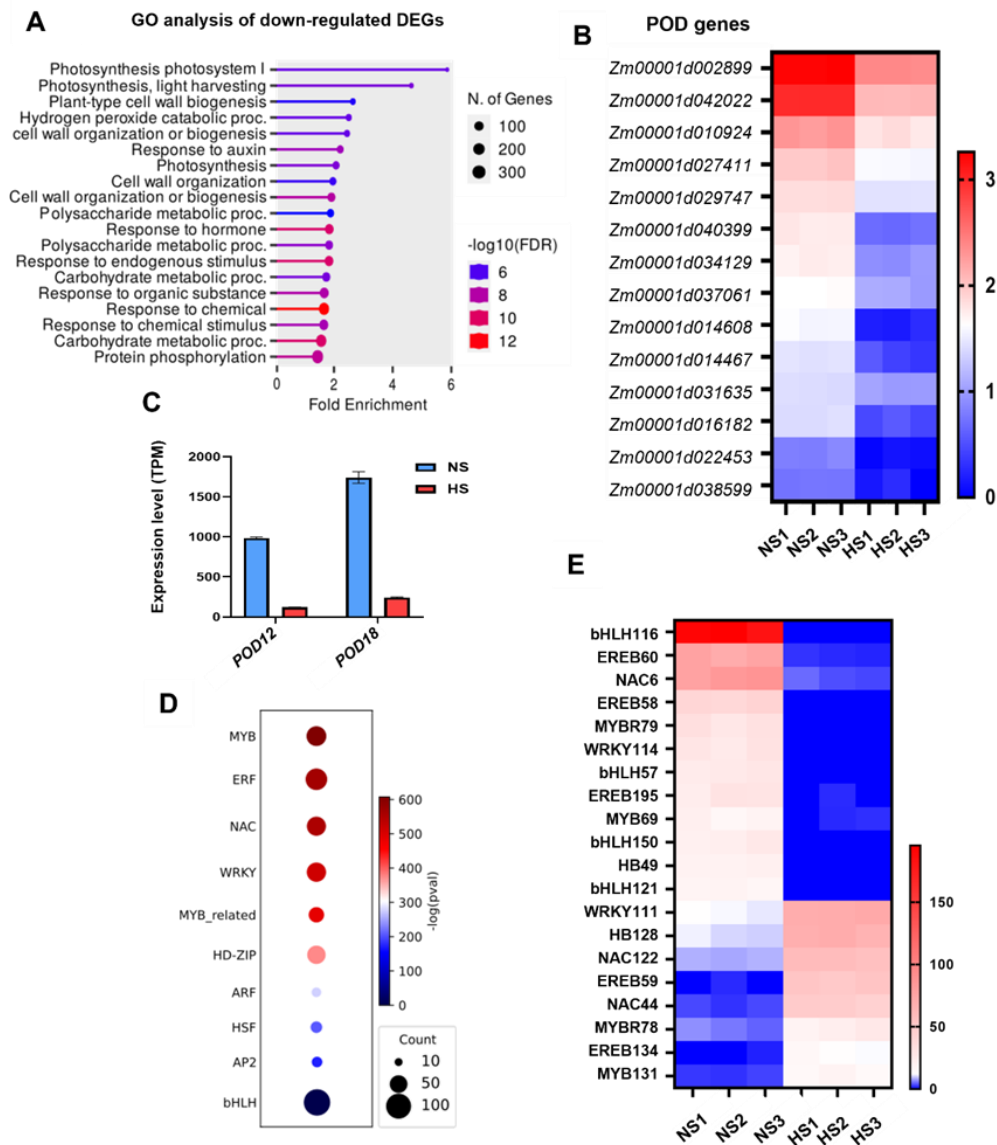


Abbildung 9: Expressionsanalyse von Genen in Narbenfäden von Mais als Reaktion auf Hitzestress. **A.** Gene Ontology (GO) biologische Prozessanreicherung von signifikant herunterregulierten Genen. **B.** Heatmap des Expressionsniveaus der unterschiedlich exprimierten Peroxidase (POD)-Gene in HS- und NS-Proben. Die Zahlen auf der Farbskala geben die Log₁₀-Werte von TPM an. **C.** Genexpressionsniveaus (TPM) der zwei am stärksten differenziell exprimierten Peroxidase (POD)-Gene. POD12: Zm00001d042022; POD18: Zm00001d002899. **D.** Blasendiagramm mit signifikant angereicherten TF-Familien als Reaktion auf Hitzestress. Die am stärksten induzierte Familie ist oben und die am stärksten herunterregulierte Familie unten im Diagramm dargestellt. **E.** Heatmap des Expressionsniveaus der 20 am stärksten differenziell exprimierten TF-Gene.

4.3 Anwendung von Sprüh-induziertem Gen-Silencing (SIGS) auf Narbenfäden von Mais

4.3.1 Anwendungen von siRNAs auf Narbenfäden von Mais

Nachdem wir wie unter 4.2 beschrieben eine Reihe von Kandidatengen für hitzeempfindliche und -tolerante Gene gefunden und deren Expression validiert hatten, könnten jetzt Knock-out- und Überexpressionslinien erzeugt werden, um die Genfunktion zu untersuchen. Darüber hinaus können die identifizierten Gene als "Leitgene" in Züchtungsprogrammen verwendet werden. Diese Verfahren sind aufwendig, zeitintensiv und werden teilweise kritisch in der Bevölkerung gesehen. Daher sollte parallel eine nicht-transgene Knock-down-Methode etabliert werden, die auf SIGS basiert. Für einen ersten Versuch wurde eine transgene Maispflanze (*pBinCM:GRX1-GFP*) mit 100%iger GFP-Expression in Papillenhaarzellen verwendet (Abbildung 10A). Alle Versuche wurden dabei ausschließlich im Labor oder Gewächshaus durchgeführt. dsRNA, die das GFP-Transkript durch SIGS inaktivieren soll, wurde erfolgreich *in vitro* durch die T7-RNA-Polymerase transkribiert. 50 ng/μl GFP-dsRNA mit 0,1 % Silwet wurde auf Narbenfäden von Mais gesprüht. 24h später zeigten 39,3 % (n=56) der Papillenhaare eine teilweise Schrumpfung und ein verringertes GFP-Signal, was möglicherweise auf den durch Silwet verursachten Zelltod zurückzuführen ist (Abbildung 10B). Bei der Besprühung mit GFP-dsRNA wurden bei 23,3 % (n=43) ebenfalls fehlgeformte Paillenhaare beobachtet, jedoch zeigten 11,6 % der Haare ein verringertes GFP-Signal (Abbildung 10C). Die Abnahme der GFP-Expression ist nach 2 Tagen stärker ausgeprägt und erreicht 34,4 % (n=58) (Abbildung 10D). RT-qPCR (Linie 4) zeigte eine signifikante Verringerung der GFP-Expression 2 Tage nach Sprühen mit dsRNA. Bei einer Wiederholung mit einer anderen transgenen Linie (Linie 13) wurde jedoch keine Verringerung des GFP-Expressionsniveaus festgestellt, was auf das geringe GFP-Transgenexpressionsniveau in dieser Linie und dem Abbau der dsRNA zurückzuführen sein könnte (Abbildung 10E). Hierzu müssen noch Experimente zur besseren Stabilisierung der dsRNA durchgeführt werden. Dies wird weiter in Kooperation mit Dr. Karina van der Linde/Prof. Dr. Gunter Meister (Universität Regensburg, BayKlimaFit2-Projektpartner #7) und Prof. Dr. Aline Koch (neu berufen an die Universität Regensburg) durchgeführt (weitere Erläuterungen unten).

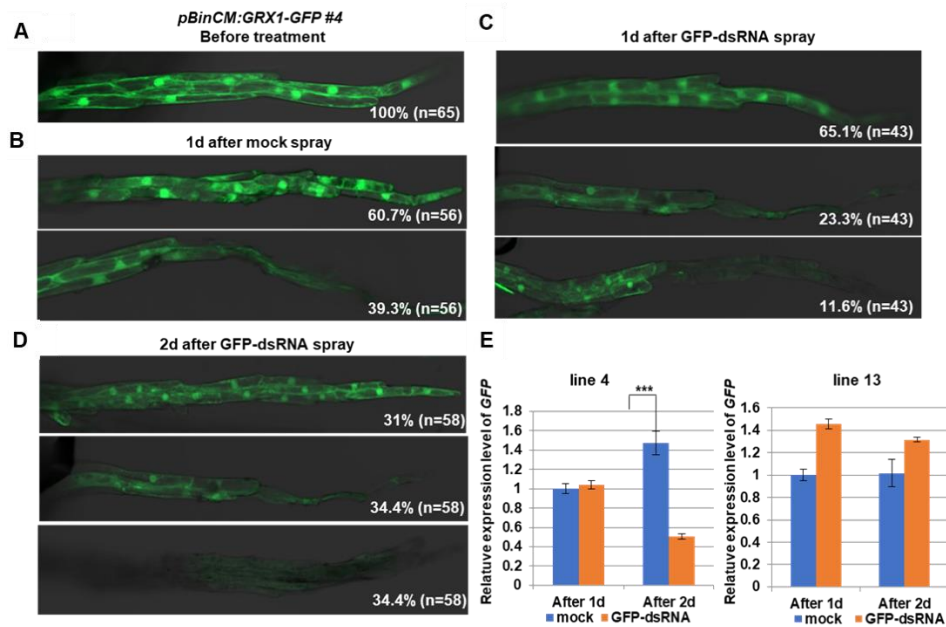


Abbildung 10: Sprüh-GFP-dsRNA-induziertes Gen-Silencing von GFP-Transgenen in Papillenhaaren von Mais. **A.-D.** GFP-Expression in Papillenhaaren von *pBinCM:GRX1-GFP*-transgenen Pflanzen vor der Behandlung (A), 1 Tag nach Mock-Spray (ohne dsRNA) (B), 1 Tag nach GFP-dsRNA-Spray (C) und 2 Tage nach GFP-dsRNA-Spray (D). Die Prozentsätze der angegebenen Expressionsmuster und die Gesamtzahlen wurden angegeben. **E.** RT-qPCR zeigt das relative Expressionsniveau des GFP-Transkripts. Linie 4 und Linie 13 sind zwei unabhängige transformierte Linien.

4.3.2 Aufnahme von dsRNAs und Transport in Narbenfäden

Um die Aufnahme und den Transport von exogen applizierter, synthetisierter dsRNA zu analysieren, wurde *in vitro* transkribierte dsRNA mit Cy3-Fluoreszenzfarbstoff markiert. Die so markierte dsRNA wurde in Wasser ohne Tensid appliziert und das Cy3-Fluoreszenzsignal untersucht. Das Signal wurde entlang der Haarzellen im Zytoplasma in 9,8 % (n=51) der beobachteten Papillenhaare beobachtet. Wurde die markierte dsRNA mit dem Tensid Silwet L-77 aufgetragen, wurde das Cy3-Signal häufiger in 64,3 % (n=28) der Papillenhaare beobachtet, wobei das Signal neben dem Zytoplasma auch in der Zellwand lokalisiert war (Abbildung 11). Ob Silwet einen apoplastischen dsRNA-Transport induzieren kann oder den Cy3-Farbstoff nur in die Zellwand der Seidenhaare verteilt, muss noch herausgefunden werden. Insgesamt kann Cy3-markierte dsRNA von der Spitze der Papillenhaare aufgenommen und über einen symplastischen Weg transportiert werden.

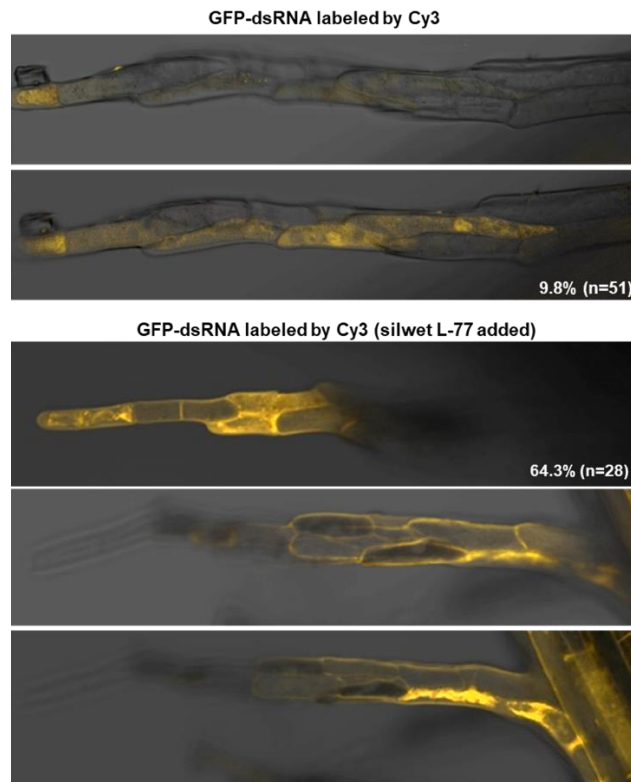


Abbildung 11: Cy3-markierte GFP-dsRNA dringt in die Papillenhaarzellen der Narbenfäden von Mais ein. Cy3-markierte GFP-dsRNA in Wasserlösung (oben) oder mit 0,1% Silwet L-77 (unten).

Dieses Arbeitspaket wurde sehr erfolgreich und vielversprechend begonnen. Wir haben SIGS an Narbenfäden getestet, wobei wir zwei GFP-Transgene und zwei hochexprimierte Gene aus Narbenfäden untersucht haben. Wir haben hierbei zwar eine Verringerung des GFP-Signals beobachtet, aber der Transkriptionsspiegel von GFP und den beiden weiteren getesteten Genen hat sich nicht signifikant verändert. Darüber hinaus konnten wir durch Sprühen mit sog. *Scavengers* ROS-Mengen auf Ausgangsniveaus reduzieren (s.o.). Insgesamt haben wir festgestellt, dass das Narbengewebe für die von uns verwendeten Sprühformulierungen für SIGS empfindlich ist und dsRNA aufgenommen werden kann. Im Vergleich zu apoplastischen ROS-Mengen konnten zytoplasmatische mRNA und Protein-Mengen jedoch mit der angegebenen Methodik nicht ausreichend herunterreguliert werden. Durch die Berufung von Prof. Dr. Aline Koch an die Universität Regensburg, eine der weltweit führenden Wissenschaftlerinnen in der SIGS-Technologie, sollen neue Formulierungen getestet werden, damit siRNAs effektiv in Getreidezellen aufgenommen werden. Aktuell werden in der AG Koch verschiedene Formulierungen getestet. Sobald die Methodik verbessert ist, sollen in Kooperation auch einige der in 4.2 beschriebenen Gene in zukünftigen Arbeiten getestet werden.

4.4 Erstellung eines Multi-omics-Atlas von Maiskeimlingen unter Kälte-, Hitze- und Trockenstress im Zeitverlauf

Neu in das Arbeitsprogramm aufgenommen wurde in Absprache mit anderen BayKlimaFit2-Partnern die Erstellung und Analyse eines Multi-omics-Atlas von sich entwickelnden Maiskeimlingen unter Umweltstress. Hierzu haben wir junge Keimlinge der B73-Inzuchtlinie über einen Zeitraum von 10 Tagen mit drei wichtigen abiotischen Stressfaktoren (Kälte, Hitze und Trockenheit) behandelt und das jeweils vierte Blatt für die RNA-seq-Analysen ausgewählt (Abbildung 12).

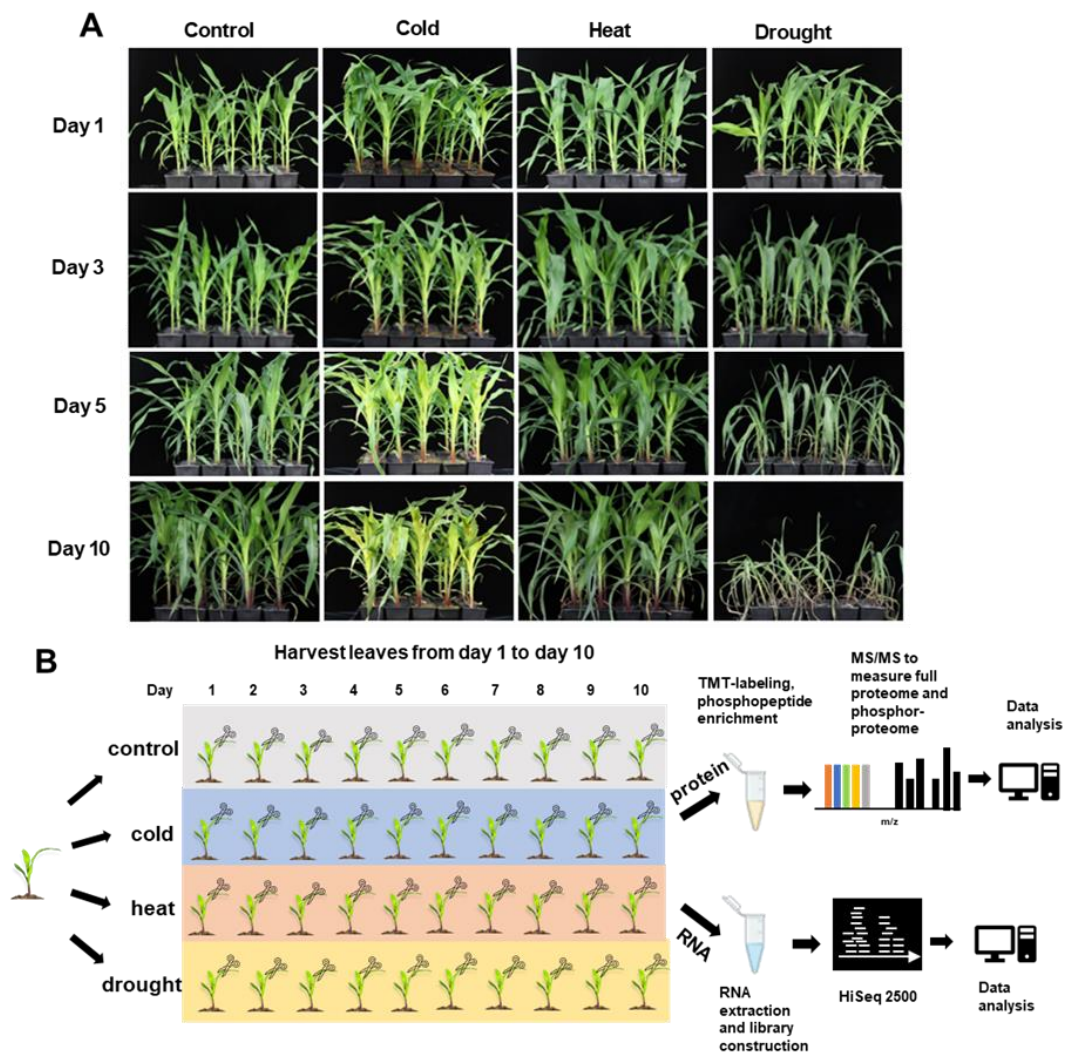


Abbildung 12: Phänotypen von Maiskeimlingen unter Trockenheits-, Hitze- und Kältebedingungen über 10 Tage und Multi-omics-Setup. **A.** Maiskeimlinge im 4-Blatt-Stadium wurden 10 Tage lang mit Kälte-, Hitze- und Trockenheitsstress behandelt. Repräsentative Bilder zeigen die Keimlinge an Tag 1, Tag 3, Tag 5 und Tag 10 nach jeder Stressbehandlung. **B.** Schematische Zeichnungen zeigen, dass die jeweils vierten Blätter von den Keimlingen unter Kontroll- und angegebenen Stressbedingungen über 10 Tage abgeschnitten wurden; anschließend wurden Proteine und RNA extrahiert und bei den angegebenen Verfahren für RNA-seq und Massenspektrometrie (MS) eingesetzt.

Die Keimlinge, die einer Hitzebehandlung unterzogen wurden, wuchsen von Tag 1 bis Tag 3 etwas schneller, zeigten dann aber keinen offensichtlichen Unterschied zu den Pflanzen, die unter Kontrollbedingungen gewachsen waren (Abbildung 12A). Die Keimlinge unter Kältestress zeigten in den ersten drei Tagen keine offensichtlichen Veränderungen, wurden dann allmählich gelb und wuchsen ab Tag 4 langsamer. Die Keimlinge unter Trockenstress zeigten in den ersten 2 Tagen keine offensichtlichen Veränderungen und die Blätter begannen ab Tag 3 zu schrumpfen (Abbildung 12A). Wir führten anschließend ein Multi-omics-Profilung der vierten Blätter von Keimlingen unter Kälte-, Hitze- und Trockenstress über 10 Tage durch. Wir verwendeten HiSeq2500 zur Erstellung der RNA-seq Daten und quantifizierten die Proteinhäufigkeit und das Phosphorylierungsniveau durch zweidimensionale Flüssigchromatographie-Tandem-Massenspektrometrie (2D-LC-MS/MS) an Tandem-Massentag (TMT)-markierten Peptiden (Abbildung 12B).

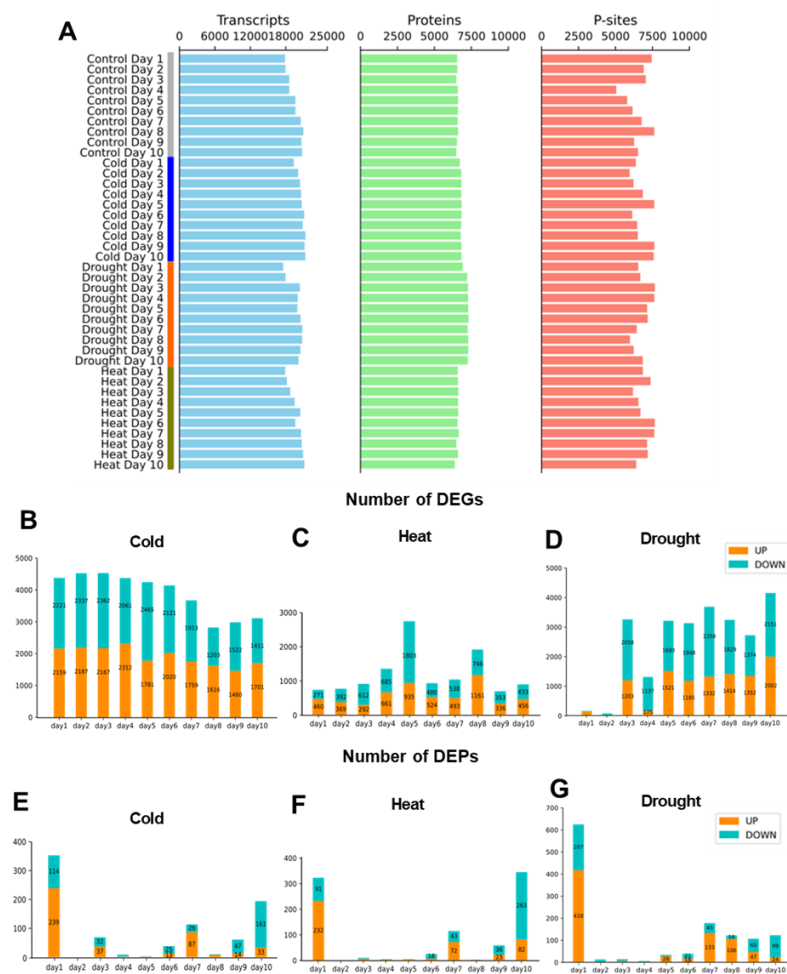


Abbildung 13: Multi-omics-Datensatz und Analyse der unterschiedlich exprimierten Gene und Proteine nach unterschiedlichem Umweltstress. **A.** Anzahl der identifizierten Transkripte, Proteine und Phosphorylierungsstellen (P-Stellen) für alle Stress-Bedingungen. **B.-D.** Anzahl der unterschiedlich exprimierten Gene (DEGs) bei Kälte (B), Hitze (C) und Trockenheit (D) von Tag 1 bis Tag 10. Die Anzahl der hoch- und herunterregulierten Gene ist in den Spalten angegeben. **E.-F.** Anzahl der differentiel exprimierten Proteine (DEPs) unter Kälte- (E), Hitze- (F) und Trockenheitsbedingungen (G) von Tag 1 bis Tag 10. Die Anzahl der hoch- und herunterregulierten Proteine ist angegeben.

Diese Analysen wurden mit jeweiligen Institutsmitteln finanziert. Mit diesen Methoden identifizierten wir anschließend im Durchschnitt etwa 20.000 Transkripte pro Blatt, 6.500 Proteine und etwa 6.500 Phosphorylierungsstellen (P-Stellen) (Abbildung 13A). Bei der Untersuchung der Transkriptomdaten fanden wir mehr als 4.000 differentiell exprimierte Gene (DEGs) unter Kältestress an Tag 1 bis Tag 6, und die Zahl sank anschließend. Das Verhältnis von hochregulierten und herunterregulierten Genen ist zu allen Zeitpunkten gleich (Abbildung 13B). Unter Hitzestress an Tag 1 bis Tag 3 gibt es weniger als 1.000 DEGs. Die Anzahl der DEGs stieg auf 1.346 an Tag 4 und weiter auf 2.738 an Tag 5, um dann an Tag 6 bis Tag 10 abzunehmen (Abbildung 13C). Unter den Bedingungen der Trockenheit gab es an Tag 1 und Tag 2 weniger als 100 DEGs. Die Anzahl der DEGs stieg an Tag 3 drastisch auf 3.261 an, was mit den phänotypischen Veränderungen ab Tag 3 übereinstimmt (Abbildung 13D). Im Allgemeinen wurden unter Hitzestressbedingungen weniger DEGs gefunden, was mit den milden phänotypischen Veränderungen sehr gut übereinstimmt. Insgesamt fanden wir 9.600, 5.469 und 7.569 DEGs über alle Tage bei Kälte-, Hitze- bzw. Trockenstress, wobei sich 3.775 Gene überschneiden (Abbildung 14A). Bei der Untersuchung der Proteomdaten identifizierten wir die höchste Anzahl differentiell exprimierter Proteine (DEPs) an Tag 1 unter allen Stressbedingungen, nämlich 353, 323 und 625 bei Kälte-, Hitze- bzw. Trockenstress. Die Anzahl der DEP nahm von Tag 2 bis Tag 6 unter allen Stressbedingungen drastisch ab und stieg dann von Tag 7 bis Tag 10 wieder leicht an (Abbildung 13E-G). Abschließend wurden die differentiell phosphorylierten Stellen (DPS) untersucht.

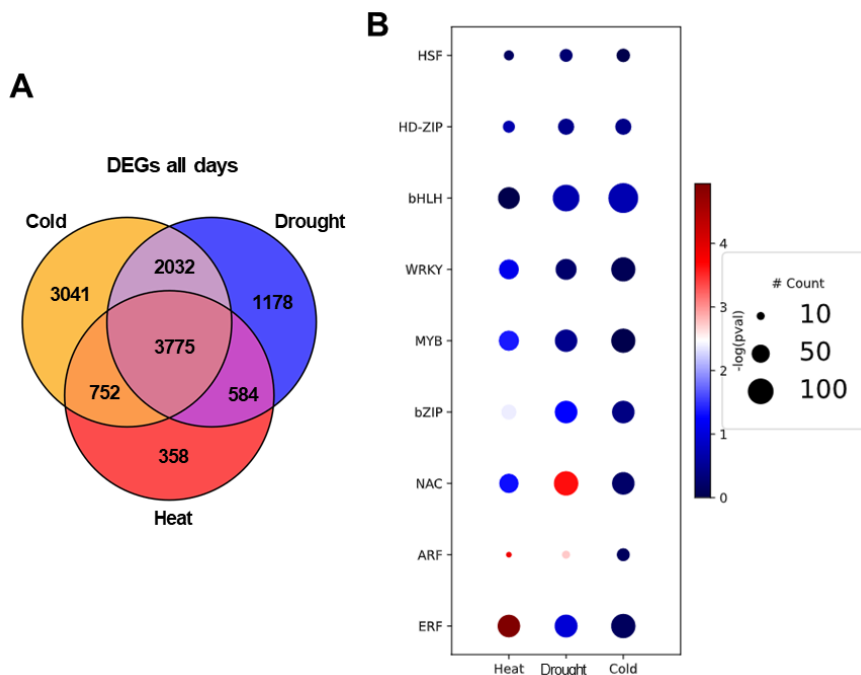


Abbildung 14: Anreicherungsanalyse von Transkriptionsfaktoren (TFs) nach verschiedenen Stress-Bedingungen. **A.** Venn-Diagramm, das die sich überschneidenden DEGs von Kälte-, Hitze- und Dürrebedingungen zeigt. **B.** Blasendiagramm mit signifikant unterschiedlich exprimierten TF-Familien von DEGs unter Hitze-, Dürre- und Kältebedingungen.

Schließlich analysierten wir die Anreicherung von Transkriptionsfaktor (TF)-Genen unter Stressbedingungen. Wir fanden heraus, dass bZIP-, ARF- und ERF-Gene bei Hitzestress stark angereichert sind. NAC- und ARF-Gene sind bei Trockenheitsstress stark angereichert

(Abbildung 14B). Insbesondere bestimmte Mitglieder der NAC und bHLH TF-Familien erschienen als sog. Hub-Gene bei mehreren Umweltstressoren und sind ebenfalls bei Hitze-stress in Narbenfäden reguliert. Sie stellen somit die am besten geeigneten Kandidatengene für weitergehende Analysen dar.

4.5 Projektfortschritt

Wie bereits oben beschrieben wurde Arbeitspaket #1 im Berichtszeitraum erfolgreich abgeschlossen (siehe hierzu auch Tabelle 2). Zusätzliche physiologische Analysen, die sich während der Projektarbeiten nach weiteren Literaturrecherchen ergeben haben, wurden aufgenommen und ebenfalls erfolgreich abgeschlossen. Ein Manuskript wurde im Herbst 2023 eingereicht. Nach Begutachtung wurde die Überarbeitung Anfang März 2024 eingereicht. Ein abschließendes Ergebnis liegt noch nicht vor. Entgegen der ursprünglichen Planung wurde die MAGIC-Population an Mais-Linien aus oben genannten Gründen nicht weiter untersucht. Mit der Inzuchtlinie B73 wurde eine sehr geeignete Linie für weitergehende Untersuchungen identifiziert.

Arbeitspaket #2 wurde mit 4-5 Monaten Verspätung ebenfalls sehr erfolgreich durchgeführt. Da die eingestellte Mitarbeiterin sich auch in bioinformatischen Analysen qualifizieren wollte, hat die Einarbeitung in Kartierung und DEG-Analysen zunächst Zeit gekostet. Diese Strategie hat sich als sehr erfolgreich herausgestellt, da die bioinformatischen Analysen und Absprachen mit Netzwerk-Bioinformatikern durch das Verständnis der biologischen Zusammenhänge sehr zielgerichtet erfolgt sind. Sehr vielversprechende Kandidatengene für weiterführende Analysen konnten so identifiziert werden.

Neu aufgenommen in dieses Arbeitspaket wurde die Analyse von Transcriptomics- und Proteomics-Daten, bei dem Maispflanzen Hitze-, Trocken- und Kältestress ausgesetzt wurden. Gemeinsam mit BayKlimaFit2-Projektpartnern #7 (Dr. K. van der Linde) und #10 (Prof. Dr. C.C. Schön) sowie einer Bioinformatik-Gruppe die von der Technischen Universität München an die Universität Hamburg (Prof. Dr. J. Baumbach) gewechselt ist, haben wir unsere Expertisen gebündelt und begonnen aus dem Datensatz Gen-regulatorische Netzwerke und Schlüssel-Stress-Gene zu identifizieren sowie eine öffentlich zugängliche Datenbank zu etablieren. Die fast abgeschlossene Analyse, die Frau Dr. Gong federführend mit Unterstützung der Hamburger Gruppe durchführt, hat es uns wesentlich erleichtern aus der Vielzahl der oben aufgezeigten regulierten Gene wenige "Hauptregulatoren" für Arbeitspaket #3 zu identifizieren. Ein Manuskript wird Mitte 2024 eingereicht und stellt aus unserer Sicht ein Highlight des Forschungsverbundes dar.

Arbeitspaket #3 soll nach vielversprechendem Beginn wie oben bereits erläutert in Kooperation mit Prof. Koch und der BayKlimaFit2-Projektpartnerin #7 (Dr. K. van der Linde) an der Universität Regensburg weitergeführt werden. In Tabelle 2 sind die ursprünglich geplanten Arbeiten mit den tatsächlich durchgeführten Arbeiten verglichen.

Tabelle 2: Gantt-Chart mit ursprünglichem detailliertem Zeitplan (graue Kästchen) und Aufgaben (A) innerhalb der Arbeitspakete (AP) und angestrebte Ziele (Z). X entspricht den tatsächlich durchgeführten Arbeiten und in orange ist eine neue Aufgabe gelistet.

AP1	KHT-Regimes und Linien-Identifizierung	Jahr 1*					Jahr 2					Jahr 3					
A1.1	Physiologische Untersuchungen	X	X	X	X	X	X	X	X								
A1.2	Analyse der MAGIC Population																
Z1.1	Erstes Verständnis der Hitzestressreaktion					X		X									
Z1.2	Identifizierung sensibler/toleranter Linien							X									
AP2	RNA-seq und Analyse von Kandidatengen	Jahr 1					Jahr 2					Jahr 3					
A2.1	Proben- und Library-Herstellung								X	X							
A2.2	RNA-seq und bioinformatische Analysen									X	X	X	X	X			
A2.3	Analyse von StressOMICS Daten (NEU)				X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
A2.4	RT-qPCR und <i>in situ</i> Hybridisierung											X	X				
A2.5	Antikörper, Proteinlokalisierung und -aktivität															X	X
Z2.1	Identifizierung von Kandidatengen											X					
Z2.2	Charakterisierung von Kandidatengen																X
AP3	Transiente Abschaltung von Genen (siRNAs)	Jahr 1					Jahr 2					Jahr 3					
A3.1	RNA-Synthese und Applikationsetablierung	X	X	X	X	X											
A3.2	Abschalten von Kandidatengen																
Z3.1	Erfolgreiche Anwendung der siRNA-Methode																
Z3.2	Präsentation der Daten auf Tagungen						X				X		X	X	X		
Z3.3	Schreiben von mind. zwei Manuskripten												X			X	

*Insgesamt wurde 35 Monate am Projekt gearbeitet. Im ersten Berichtsjahr wurde nur 11 Monate am Projekt gearbeitet, so dass der Gesamtplan leicht verzögert war.

5 Veröffentlichungen im Rahmen des Projekts

Publikationen

Gong, W., Oubounyt, M., Baumbach, J., and Dresselhaus, T. (2024) "*Heat stress induced ROS in maize silks cause late pollen tube growth arrest and sterility*". *iScience*, doi.org/10.1016/j.isci.2024.110081.

Gong, W., Oubounyt, M., Kevin Begcy, Xingli Li, Karina van der Linde, Viktoriya Avramova, Olga Zolotareva, Baumbach, J., and Dresselhaus, T. (2024) "*MaizeStressDB: An online resource for temporal multi-omics analysis and regulatory network reconstruction controlling abiotic stresses in maize over time*". (Manuskript in Vorbereitung).

Gong, W., and Dresselhaus, T. (2024) "*Ertragsverlust durch Hitzestress in der Bestäubungsphase*". *Mais*, (Manuskript in Vorbereitung auf Einladung der Zeitschrift).

Poster (siehe Anhang)

Gong, W., and Dresselhaus, T. "*Reduction in fertility after moderate heat stress application during silking of maize ears*". Präsentation auf der *26th International Conference on Plant Reproduction Research* (Prag, Tschechien), 20.-24. Juni 2022.

Gong, W., and Dresselhaus, T. "*Reduction in fertility after moderate heat stress application during silking of maize ears*". Präsentation auf der *SFB924 Symposium Plant Biology of the next generation* (Freising), 12.-14. Apr. 2023.

Gong, W., Oubounyt, M., Baumbach, J., and Dresselhaus, T. "*Heat stress induced pollen tube growth arrest and sterility supported by a MaizeStressDB*". Präsentation auf der *66th Annual Maize Genetics Conference* (Raleigh, USA), 29. Febr.-3. März 2024.

Vorträge

Gong, W. "*Heat stress induced ROS in maize silks cause late pollen tube growth arrest and sterility*". Präsentation beim *RECROP NextGen (COST Action CA22157) Meeting* am 4. März 2024.

Dresselhaus, T. "*Heat stress induced sterility in maize caused by pollen development and tube growth defects supported by a MaizeStressDB*". Präsentation beim *First RECROP Annual Meeting* (Murcia, Spanien), 22. Mai 2024.

Patentanmeldungen

keine

6 Vernetzungen

- Dr. K. van der Linde/Prof. Dr. G. Meister (Universität Regensburg, Projektpartner #7) zusammen mit Prof. Dr. A. Koch (alle Universität Regensburg): SIGS-Anwendungen von siRNAs auf verschiedene Maisgewebe inkl. Narbenfäden
- Dr. K. van der Linde (Universität Regensburg, Projektpartner #7) und Prof. Dr. C.C. Schön (Technische Universität München, Projektpartner #10) sowie Prof. Dr. J. Baumbach (Universität Hamburg): gemeinsame Analyse von Transkriptomics-, Proteomics- und Phosphoproteomics-Daten (s.o.)

7 Bestehende und entstandene Industriebeteiligung/-en

Es wurde mit der Firma KWS ein *Testing-Agreement* verhandelt, um deren patentierte "Regeneration-Booster-Technologie" anzuwenden und hierbei Gen-editierte Maispflanzen ohne klassische Gentechnologie zu erzeugen. Diese Methode hätte es uns erleichtert die Funktion von selektierten Kandidatengen und die Toleranz editierter Linien auf Hitzestress zu untersuchen. Durch ständig verschleppte Bürokratie seitens beider Parteien (KWS und Universität Regensburg) und einer Klausel seitens der KWS das Material nach Beendigung des Projekts vernichten zu müssen, ist ein Agreement nicht zustande gekommen.

8 Zusammenfassung

Das Forschungsvorhaben ist am 1. Juli 2021 mit einem Monat Verzögerung gestartet und hatte das Ziel, an der für Bayern wichtigen Nutz- und Energiepflanze Mais zu untersuchen, welchen Effekt durch den Klimawandel verursachte zunehmende Hitzeperioden in der Reproduktionsphase - insbesondere während der Bestäubung – auf den Korntrug haben. Mit Hilfe des erzeugten Wissens sollen mittelfristig widerstandsfähigere und an den Klimawandel besser angepasste Sorten sowie neue Konzepte entwickelt werden, um auch in Zukunft die Erträge für die bayerische Landwirtschaft trotz weiter zunehmender Hitzestressperioden zu sichern.

Für das Projekt wurde Frau Dr. Wen Gong eingestellt, die vorher an der Universität Freiburg promoviert und dort vor Beginn des Projektes noch ein Jahr als Postdoc primär an *Arabidopsis* gearbeitet hat. Nach dem Wechsel an die Universität Regensburg hat Frau Dr. Gong zunächst Mais als Modellsystem kennengelernt und anschließend zahlreiche physiologische Methoden für die Untersuchung von Narbenfäden von Mais etabliert. Im ersten Berichtszeitraum konnte sie u.a. zeigen, dass moderater Hitzestress für nur 1–2 Tage bei 35°C am Tag und 25°C in der Nacht zu erhöhtem Zelltod und verminderter Zellvitalität der Papillenhaarzellen führt und auch die Plasmamembranintegrität negativ beeinflusst wird. Auch konnte sie zeigen, dass Hitzestress einen späten Wachstumsstopp des Pollenschlauchs im distalen Bereich der Narbenfäden verursacht und kaum Pollenschläuche die Samenanlage erreichen. Hierdurch ist die Kornbildung dramatisch reduziert. Ein Indikator für Stress sind häufig reaktive Sauerstoffspezies (ROS). Es sollte daher weiter untersucht werden, inwieweit ROS zum

verminderten Pollenschlauchwachstum führt. Dies wurde bestätigt und es konnte gezeigt werden, dass die Menge an reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) in Narbenfäden nach Hitzestress deutlich ansteigt. Wenn Hitze-gestresste Pflanzen nach Bestäubung unter Kontrollbedingungen wachsen, nimmt nicht nur die ROS-Menge ab, sondern die Fertilität ist nicht beeinflusst. Daher wurde die Hypothese aufgestellt, dass hohe ROS-Mengen während des Pollenschlauchwachstums in Narbenfäden kritisch für die Fertilität ist. Es konnte gezeigt werden, dass Hitzestress ROS-Mengen stark induziert und hierbei die Mengen von Superoxid (O_2^-) und Peroxid (H_2O_2) durch Sprühen von Radikalfängern wie $MnCl_2$ und dem Enzym Superoxiddismutase (SOD) nahezu auf Ausgangszustände reduziert werden und die Sterilität größtenteils aufgehoben werden kann.

Die distalen Bereiche der Narbenfäden, in denen unter Hitzestress die Pollenschläuche aufhören zu wachsen wurden anschließend gesammelt und neben verschiedenen Kontrollen mit und ohne Bestäubung sequenziert (insgesamt 18 Proben). 844 hochregulierte und 3.136 herunterregulierte Gene wurden so nach moderatem Hitzestress in Narbenfäden identifiziert. Es wurde anschließend gezeigt, dass insbesondere Gene für Peroxidasen, die ROS abbauen, durch Hitzestress nahezu abgeschaltet werden. Darüber hinaus wurden Gene für Hitzestress-induzierte NAC-Transkriptionsfaktoren und für abgeschaltete bHLH-Transkriptionsfaktoren identifiziert. Hiermit bietet dieser Teil der Studie bereits jetzt eine solide Grundlage für die Auswahl von Genen für die Marker-gestützte Pflanzenzüchtung und die Entwicklung von hitzestresstoleranten Pflanzen während der Reproduktionsphase.

Um noch genauer herauszufinden ob regulierte Gene nach Bestäubung aus Pollenschläuchen oder aus Narbenfäden stammen, wurden Narbenfäden der Inzuchtlinie B73 mit Pollen der Inzuchtlinie Mo17 bestäubt – beim Vergleich dieser Inzuchtlinien befinden sich in fast allen Genen SNPs, so dass die Transkripte aus Pollen und Narbenfäden gut unterschieden werden können. Die bioinformatische Analyse stellte sich als Herausforderung dar und wird aktuell noch in Kooperation mit Prof. Dr. J. Baumbach (Universität Hamburg) weitergeführt.

Als neues Ziel im Forschungsverbund ist die Möglichkeit entstanden durch die gebündelte Expertise den ersten hochgradig reproduzierbaren Multi-omics-Atlas von Maispflanzen unter verschiedenen Umweltbedingungen und im Zeitverlauf zu erstellen. Wir haben Maiskeimlinge über einen Zeitraum von zehn Tagen drei großen abiotischen Stressfaktoren (Kälte, Hitze und Trockenheit) ausgesetzt. Über 5.000 differentiell exprimierte Gene (DEGs) und über 1.000 differentiell exprimierte Proteine (DEPs) konnten unter den jeweiligen Stressbedingungen gefunden werden. Zur Identifizierung und Untersuchung von Knotenpunktgenen, die an abiotischem Stress beteiligt sind, haben wir eine Datenbank und eine Weboberfläche mit dem Namen *MaizeStressDB* entwickelt, die eine dynamische Analyse der Gen- und Proteinexpression im Zeitverlauf und die Rekonstruktion von genregulatorischen Netzwerken (GRNs) ermöglicht, die die Stressreaktionen zeitlich steuern. Funktionelle DEGs und GRNs können im Webbrowser identifiziert und mit zentralen Regulatoren als Reaktion auf Kälte-, Hitze- und Trockenstress in Verbindung gebracht werden. Wir haben *MaizeStressDB* beispielhaft verwendet, um Transkriptionsfaktoren als Kernregulatoren zu identifizieren, die einzeln Kälte-, Hitze- und Trockenstressreaktionen vermitteln, sowie Transkriptionsfaktoren, die sowohl Kälte- als auch Hitze- bzw. Hitze- und Trockenstressreaktionen vermitteln. Hierbei

wurden NAC-Transkriptionsfaktoren als zentrale Regulatoren bei Hitzestress in der vegetativen und reproduktiven Entwicklungsphase (inkl. Pollenschlauchwachstum) von Mais identifiziert.

Schließlich sollte durch die neue SIGS-Technologie (Sprüh-induziertes Gen-Silencing) Gene in Papillenhaarzellen von Mais herunterreguliert werden. In ersten Experimenten konnte die Expression von Markergenen bereits auf 35% reduziert werden. Probleme bestehen aber in der Stabilisierung der eingesetzten dsRNAs. Durch die Berufung von Prof. Dr. Aline Koch an die Universität Regensburg, eine der weltweit führenden Wissenschaftlerinnen in der SIGS-Technologie, haben wir beschlossen dieses Arbeitspaket zukünftig in Kooperation weiterzuführen. Frau Prof. Koch erforscht aktuell an neuen Formulierungen, um dsRNAs zu stabilisieren und die Aufnahme in Getreidearten inkl. Mais zu verbessern. Wir wollen diese in den kommenden Monaten ebenfalls bei Mais-Narbenfäden an Marker- und Kandidatengenen testen.

Zusammenfassend wurden im Forschungsvorhaben molekulare und physiologische Mechanismen und Gene entdeckt, die einen Beitrag leisten können jetzt (i) Hitzestress-toleranten Mais und andere verwandte Nutzpflanzen wie Gerste und Weizen zu züchten, die besser an den Klimawandel angepasst sind. Darüber hinaus wurde (ii) mit der SIGS-Technologie an Lösungen gearbeitet, um flexibler auf Hitzestressperioden reagieren zu können. Beide Ansätze sind Kernkomponenten der Klima-Anpassungs-Strategien in Bayern (KASB) um im Bereich der Landwirtschaft, der besonders stark vom Klimawandel betroffen ist, u.a. die Erträge für bayerische Landwirte und Pflanzenzüchter auch in Zukunft zu sichern.

9 Ausblick

Das Forschungsvorhaben ist nicht vollständig abgeschlossen. Nicht nur wesentliche Mechanismen der Hitzestress-vermittelten Sterilität konnten aber bereits herausgefunden werden, insbesondere wurden mit Peroxidasen und bestimmten Transkriptionsfaktoren sehr vielversprechende Kandidatengene identifiziert, die jetzt genutzt werden können, um Maispflanzen zu entwickeln, die tolerant gegenüber transientem Hitzestress in der Bestäubungsphase sind. Um das Forschungsvorhaben fortsetzen zu können und auch andere Aspekte der Hitzestress-vermittelten Pollenentwicklungsdefekte untersuchen zu können, wurde Ende Januar 2024 ein Antrag beim BMBF eingereicht. Am geplanten Forschungsverbund ist auch BayKlimaFit2-Partnerin #7 (Dr. K. van der Linde) beteiligt. Da die Forschungsthematik hochaktuell und auch gesellschaftsrelevant ist, wird auch die Universität Regensburg das Vorhaben weiterhin unterstützen. Aktuell beginnt gerade der Bau einer Pflanzenkulturhalle an der Universität Regensburg, in der Umweltbedingungen bei großen Nutzpflanzen wie Mais genau reguliert und simuliert werden können. Dies ist eine Grundvoraussetzung bei der Entwicklung Umweltstress-toleranter Nutzpflanzen.

Literaturverzeichnis (*eigene Publikationen)

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. Bitá, 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. *Dresselhaus, T., and Hückelhoven, R. (2019). Biotic and abiotic stress responses in crop plants. MDPI Open Access Publisher. 252 Seiten. ISBN 978-3-03897-464-2.
4. Chaudhary, S., Devi, P., Bhardwaj, A., Jha, U.C., Sharma, K.D., Prasad, P.V.V., Siddique, K.H.M., Bindumadhava, H., Kumar, S., and Nayyar, H. (2020). Identification and characterization of contrasting genotypes/cultivars for developing heat tolerance in agricultural crops: Current status and prospects. *Front Plant Sci* 11, 587264.
5. Asseng, S., Foster, I., and Turner, N.C. (2011). The impact of temperature variability on wheat yields. *Global Change Biol* 17, 997-1012.
6. *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.
7. Prasad, P.V.V., Bheemanahalli, R., and Jagadish, S.K. (2017). Field crops and the fear of heat stress—opportunities, challenges and future directions. *Field Crops Res.* 200, 114–121.
8. Zhu, J.K. (2016). Abiotic stress signaling and responses in plants. *Cell* 167, 313-324.
9. Ohama, N., Sato, H., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2017). Transcriptional regulatory network of plant heat stress response. *Trends Plant Sci* 22, 53-65.
10. Guo, X., Liu, D., and Chong, K. (2018). Cold signaling in plants: Insights into mechanisms and regulation. *J Integr Plant Biol* 60, 745-756.
11. Zhang, H., Zhu, J., Gong, Z., and Zhu, J.K. (2022). Abiotic stress responses in plants. *Nat Rev Genet* 23, 104-119.
12. *Begcy, K., Nosenko, T., Zhou, L.Z., Fagner, L., Weckwerth, W., and Dresselhaus, T. (2019). Male sterility in maize after transient heat stress during the tetrad stage of pollen development. *Plant Physiol* 181, 683-700.
13. *Li, X., Bruckmann, A., Dresselhaus, T., and Begcy, K. (2024). Heat stress at the bicellular stage inhibits sperm cell development and transport into pollen tubes. *Plant Physiol*. doi: 10.1093/plphys/kiac087.
14. Sadok, W., Lopez, J.R., and Smith, K.P. (2020). Transpiration increases under high-temperature stress: Potential mechanisms, trade-offs and prospects for crop resilience in a warming world. *Plant Cell Environ.* 44, 2102-2116.
15. Waszczak, C., Carmody, M., and Kangasjärvi, J. (2018). Reactive oxygen species in plant signaling. *Annu Rev Plant Biol* 69, 209-236.
16. Zhang, M.J., Zhang, X.S., and Gao, X.Q. (2020). ROS in the male-female interactions during pollination: Function and regulation. *Front Plant Sci* 11, 177.
17. *Zhou, L.Z., and Dresselhaus, T. (2023). Multiple roles of ROS in flowering plant reproduction. *Adv Bot Res* 105, 139-176.
18. Jiang, C., Sun, J., Li, R., Yan, S., Chen, W., Guo, L., Qin, G., Wang, P., Luo, C., Huang, W., et al. (2022). A reactive oxygen species burst causes haploid induction in maize. *Mol Plant* 15, 943-955.
19. Zhang, K., Wang, F., Liu, B., Xu, C., He, Q., Cheng, W., Zhao, X., Ding, Z., Zhang, W., Zhang, K., et al. (2021). ZmSKS13, a cupredoxin domain-containing protein, is required for maize kernel development via modulation of redox homeostasis. *New Phytol* 229, 2163-2178.
20. Meng, D., Zhao, J., Zhao, C., Luo, H., Xie, M., Liu, R., Lai, J., Zhang, X., and Jin, W. (2018). Sequential gene activation and gene imprinting during early embryo development in maize. *Plant J* 93, 445-459.

21. Zhang, M., Zhao, H., Xie, S., Chen, J., Xu, Y., Wang, K., Zhao, H., Guan, H., Hu, X., Jiao, Y., et al. (2011). Extensive, clustered parental imprinting of protein-coding and noncoding RNAs in developing maize endosperm. *Proc Natl Acad Sci U S A* *108*, 20042-20047.
22. Schramm, F., Larkindale, J., Kiehlmann, E., Ganguli, A., English, G., Vierling, E., and von Koskull-Döring, P. (2008). A cascade of transcription factor DREB2A and heat stress transcription factor HsfA3 regulates the heat stress response of Arabidopsis. *Plant J* *53*, 264-274.
23. Seo, J.S., Joo, J., Kim, M.J., Kim, Y.K., Nahm, B.H., Song, S.I., Cheong, J.J., Lee, J.S., Kim, J.K., and Choi, Y.D. (2011). OsbHLH148, a basic helix-loop-helix protein, interacts with OsJAZ proteins in a jasmonate signaling pathway leading to drought tolerance in rice. *Plant J* *65*, 907-921.
24. Sato, H., Mizoi, J., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2024). Complex plant responses to drought and heat stress under climate change. *Plant J* *117*, 1873-1892.