

Genetic analysis of anther opening and of heat stress responses
during stamen maturation in barley

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

Mohamed Redha El-Amine Herma

aus Tissemsilt

Algerien

Köln, 2022

Die vorliegende Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für Pflanzenzüchtungsforschung in Köln innerhalb der unabhängigen Forschungsgruppe von Dr. Ivan F. Acosta angefertigt.



MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT



Max-Planck-Institut für
Pflanzenzüchtungsforschung

Erster Referentin und Prüferin:

Prof. Dr. Ute Höcker

Zweite Referent und Prüfer:

Prof. Dr. Stanislav Kopriva

Beisitzer/Schriftführer:

Dr. Ivan F. Acosta

Vorsitzende der Prüfungskommission:

Prof. Dr. Gunther Döhlemann

Tag der Disputation:

26.08.2022

Summary

The global population is expected to reach 9 billion by 2050. One of the major challenges of the 21st century is to increase food production to meet the demands of this constantly growing population. Climate change, among other threats, is anticipated to affect agricultural production and crop plasticity, leading to a failure in global food production. Therefore, it is a necessity to create higher-yielding crops that are more resilient and adaptable to future farming conditions. Understanding the fundamental biology of crop reproductive development is an important step to create innovative solutions to tackle this challenge. For example, hybrid crops are a promising avenue to improve yields but their use remains limited because versatile systems of male fertility control are lacking. The process of anther dehiscence or opening, which releases pollen for fertilization, is an interesting target for male fertility modulation that remains understudied in crops. In the first part of this dissertation, I present the characterization of two barley mutants specifically impaired in anther opening, which almost completely abolishes male fertility, without compromising pollen viability. The first mutant is unable to separate septum and stomium cells so that the viable pollen remains enclosed within most anthers. The mutation occurs in a putative endo-1,4-beta-xylanase involved in the degradation of xylan, the major component of hemicellulose in plant cell walls. Such activity has not been previously implicated in anther opening and it strengthens the view that cell wall weakening is a major driver of septum and stomium separation. Previous work characterized *msg36*, another septum/stomium separation mutant with partial fertility and affected in a putative pectin-degrading enzyme. A double *msg36*; *xylanase* mutant causes complete sterility indicating that both activities are vital to loosen the cell walls surrounding septum and stomium cells.

The second anther opening mutant that I characterized is unable to form the ligno-cellulosic cell wall thickenings that are typical of anther endothecium cells and essential for anther opening. This defect is associated with pale anthers and, accordingly, chloroplasts in the endothecium layer appear to accumulate less chlorophyll. Moreover, transcriptome profiling showed that the categories of genes downregulated in the mutant are enriched not only in secondary cell wall biogenesis but also in photosynthesis-related activities. We propose that a primary function of endothelial photosynthesis is to fix and channel the carbon required in lignin and cellulose synthesis pathways. Identification of the mutant gene is pending and it is necessary to further test this model.

In the second part of this dissertation, I focused on the effect of heat stress during the phase of stamen maturation in barley and on efforts to identify sources of heat tolerance. I subjected a pool of Mediterranean barley landraces to a heat wave coinciding with post-meiotic stamen maturation and found lines either strongly affected in fertility or tolerant to the stress. One tolerant (GB2) and one sensitive (GB16) landraces were selected for further analyses. Heat stress accelerated anther morphological development in both genotypes. Moreover, pollen starch accumulation occurred normally in both GB2 and GB16 at high temperatures, indicating that the sensitivity of GB16 is due to other aspects of male or female fertility that we are not able to distinguish at this point. The

transcriptome of GB2 under control and heat conditions during the stages of pollen starch filling revealed an additional acceleration of development induced by heat at the transcriptional level. Furthermore, heat-stressed GB2 stamens upregulate a discrete subset of 30 genes, mostly encoding heat shock proteins that we propose are mediating GB2's tolerance to the stress. Thus, either these genes or their regulators are promising targets to breed heat tolerant barley stamens.

Zusammenfassung

Die Weltbevölkerung wird bis 2050 voraussichtlich 9 Milliarden Menschen erreichen. Eine der größten Herausforderungen des 21. Jahrhunderts besteht darin, die Nahrungsmittelproduktion zu steigern, um den Bedarf der ständig wachsenden Bevölkerung zu decken. Der Klimawandel und andere Bedrohungen werden die landwirtschaftliche Produktion und die Plastizität der Pflanzen beeinträchtigen, was zu einem Ausfall der weltweiten Nahrungsmittelproduktion führen kann. Daher ist es notwendig, ertragreichere Pflanzen zu züchten, die widerstands- und anpassungsfähiger an künftige Anbaubedingungen sind. Das Verständnis der Grundlagenbiologie zur Reproduktionsentwicklung von Nutzpflanzen ist ein wichtiger Schritt, um innovative Lösungen für diese Herausforderung zu finden. So sind beispielsweise Hybridpflanzen, ein vielversprechender Ansatz zur Verbesserung der Erträge. Jedoch bleibt ihr Einsatz begrenzt, weil es an anpassungsfähigen Systemen zur Kontrolle der männlichen Fruchtbarkeit mangelt. Der Prozess der Antherenöffnung, bei dem Pollen für die Befruchtung freigesetzt werden, ist ein interessantes Ziel für die Beeinflussung der männlichen Fruchtbarkeit, das bei Nutzpflanzen noch wenig erforscht ist. Im ersten Teil dieser Dissertation stelle ich die Charakterisierung von zwei Gerstenmutanten vor, die gezielt in der Antherenöffnung eingeschränkt sind, was zur vollständigen Aufhebung der männlichen Fruchtbarkeit führt, ohne dabei die Lebensfähigkeit der Pollen zu beeinträchtigen. Die erste Mutante ist nicht in der Lage, Septum- und Stomiumzellen zu trennen, so dass der lebensfähige Pollen in den meisten Antheren enthalten bleibt. Die Mutation tritt in einer vermeintlichen Endo-1,4-beta-Xylanase auf, die am Abbau von Xylan, dem Hauptbestandteil der Hemicellulose in Pflanzenzellwänden, beteiligt ist. Eine solche Aktivität wurde bisher noch nicht mit der Öffnung von Staubbeuteln in Verbindung gebracht und unterstützt die Theorie, dass die Schwächung der Zellwände ein Hauptgrund für die Trennung von Septum und Stomium ist. In früheren Arbeiten wurde *msg36*, eine weitere Mutante im Hinblick auf Trennung von Septum und Stomium charakterisiert, die aufgrund des Defekts eines mutmaßlichen Pektinase eine reduzierte Fruchtbarkeit aufweist. Eine *msg36*/Xylanase-Doppelmutante führt zu vollständiger Sterilität, was darauf hindeutet, dass die Aktivität beider Enzyme für die Auflockerung der Zellwände, die die Septum- und Stomiumzellen umgeben, unerlässlich sind.

Die zweite von mir charakterisierte Mutante zur Antherenöffnung ist nicht in der Lage, die lignozellulose Zellwandverdickungen zu bilden, die für die Endotheciumzellen der Antheren typisch und für die Antherenöffnung notwendig sind. Dieser Defekt geht mit blassen Antheren einher und entsprechend scheinen die Chloroplasten in der Endotheciumschicht weniger Chlorophyll anzusammeln. Darüber hinaus zeigte die Transkriptomeanalyse, dass die in der Mutante herunterregulierten Genkategorien nicht nur in der sekundären Zellwandbiogenese, sondern auch in photosynthesebezogenen Aktivitäten angereichert sind. Wir schlagen vor, dass eine der primären Funktionen der endothecischen Photosynthese darin besteht, den für Lignin- und

Zellulosesynthesewege erforderlichen Kohlenstoff zu fixieren und zu kanalisieren. Die Identifizierung des mutierten Gens steht noch aus, und es ist notwendig, dieses Modell weiter zu testen.

Im zweiten Teil dieser Dissertation habe ich mich darauf konzentriert, die Auswirkungen von Hitzebelastung während der Phase der Staubblattreifung bei Gerste und den genetischen Ursprung für Hitzetoleranz zu identifizieren. Hierfür unterzog ich verschiedene mediterrane Gerstensorten während der postmeiotischen Reifung der Staubgefäße einer Hitzeperiode und habe Linien gefunden, die entweder stark in ihrer Fruchtbarkeit beeinträchtigt oder tolerant gegenüber dem Stress sind. Eine tolerante (GB2) und eine anfällige (GB16) Landrasse wurden für weitere Analysen ausgewählt. Hitzebelastung beschleunigte bei beiden Genotypen die morphologische Entwicklung der Antheren. Darüber hinaus erfolgte unter hohen Temperaturen die Anhäufung von Pollenstärke sowohl bei GB2 als auch GB16. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass die Empfindlichkeit von GB16 auf andere Aspekte der männlichen oder weiblichen Fruchtbarkeit zurückzuführen ist, die wir zum jetzigen Zeitpunkt nicht unterscheiden können. Die Transkriptomanalyse von GB2 unter Kontroll- und Hitzebedingungen während der Stadien der Pollenstärkefüllung zeigte eine zusätzliche, durch Hitze induzierte Beschleunigung der Entwicklung des Gerstenstaubblattes auf der Transkriptionsebene. Weiterhin wurde in hitzebelasteten GB2-Staubblättern eine Untergruppe von 30 Genen hochreguliert, von denen die meisten für Hitzeschockproteine kodieren, die wahrscheinlich zu der Toleranz von GB2 beitragen. Somit sind entweder diese Gene oder ihre Regulatoren vielversprechende Kandidaten für die Züchtung hitzetoleranter Gerstenstaubblätter.