

# Klimastress-Toleranz in Gerste - Identifizierung assoziierter Gene durch umfassende quantitative Expressionsanalyse

## Climatic stress tolerance in barley - Identification of associated genes by comprehensive quantitative expression analysis

Kerstin Hofmann<sup>1</sup>, Manuela Diethelm<sup>1</sup>, Markus Herz<sup>2</sup>, Andreas Albert<sup>3</sup>, Jana Barbro Winkler<sup>3</sup>,  
Dietrich Ernst<sup>3</sup>, Urs Schmidhalter<sup>4</sup>, Carola Wagner<sup>5</sup>, Fritz Thümmeler<sup>6</sup>, Diego Riano-Pachon<sup>7</sup>,  
Sabrina Kleeßen<sup>7</sup>, Marc Lohse<sup>7</sup>, Birgit Kersten<sup>7</sup> und Günther Schweizer<sup>1\*</sup>

### Abstract

As the first consequences of the climatic change can be observed by now, the demand for barley varieties tolerant to abiotic stress will soon increase. But as these tolerances are usually of a quantitative nature, it is essential to find the genes involved and to understand the function of these genes, before trying to breed for effective and enduring tolerance. For this purpose three genotypes differing in tolerance to drought stress were submitted to an experiment in the exposition chambers at the Helmholtz Center in Munich. In this experiment the plants were submitted to drought stress and/or increased UV radiation. Samples for RNA extraction were taken at ten dates throughout the experiment. Four of those sampling dates covering the whole drought stress period were chosen for a transcriptome analysis with a 44k Agilent Microarray and a 454 sequencing assay. The resulting data is currently being analyzed at the Max Planck Institute for Molecular Plant Physiology in Golm. The expression data will be visualized on barley signaling pathways using the MapMan tool. Thereby candidate genes related to drought stress will be identified. Those candidate genes will be validated with Real-Time PCR and correlated with the phenotypic data from the experiment.

### Keywords

Climatic stress, drought stress, *Hordeum vulgare*, transcriptome analysis, UV stress

### Einleitung

Die ersten Auswirkungen des Klimawandels sind bereits zu spüren. Die Nachfrage nach Sorten, die gegenüber abiotischem Stress tolerant sind, dürfte daher stark ansteigen.

Da diese Toleranzen aber meist quantitativ bedingt sind (CATTIVELLI et al. 2008), ist es essentiell, zunächst die beteiligten Gene zu identifizieren und ihren Einfluss auf Funktion und Sorte zu verstehen. Ziel dieses Projektes ist es, über eine umfassende vergleichende Transkriptomanalyse solche Gene zu identifizieren und ihre Rolle bezüglich Trockenstress-Toleranz weiter aufzuklären.

### Material und Methoden

Das Experiment wurde in den Expositionskammern des Helmholtz Zentrums in Neuherberg, München, durchgeführt. Drei zweizeilige Sommergersten-Genotypen wurden auf ihre Toleranz gegenüber Trocken- und UV-Stress untersucht: Barke, eine deutsche Braugerstensorte, Mut6519, eine Akzession aus Argentinien, die durch gute Toleranz gegenüber Trockenstress aufgefallen ist und IPZ24727, ein Zuchtstamm des Institutes für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung an der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft.

Die drei Genotypen wurden in speziellen Röhren parallel in vier Expositionskammern angebaut. Je Röhre wurden vier Pflanzen ausgesät. Die Pflanzen in der linken Kammerhälfte wurden während des ganzen Versuches durchgehend bewässert, während die Pflanzen in der rechten Kammerhälfte einer Trockenperiode von 12 Tagen ausgesetzt wurden, beginnend jeweils im Entwicklungsstadium BBCH 59 (Ende Ährenschieben).

In zwei der Kammern wurde die UV-Strahlung auf normalem Level gehalten, in den anderen beiden Kammern waren die Pflanzen einer deutlich erhöhten UV-Strahlung ausgesetzt. Das simulierte Wetter in den Kammern entsprach dem Durchschnitt der Jahre 2004-2006, beginnend Anfang April und endend Mitte August. Proben wurden zu zehn Zeitpunkten über die gesamte Dauer des Experimentes genommen. Die Zeitpunkte wurden abhängig vom Entwicklungsstadium

<sup>1</sup> Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft, Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung 1b, Am Gereuth 2, D-85354 FREISING

<sup>2</sup> Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft, Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung 2b, Am Gereuth 6, D-85354 FREISING

<sup>3</sup> Helmholtz Zentrum München, Abteilung Experimentelle Umweltsimulation (EUS), Ingolstädter Landstraße 1, D-85764 NEUHERBERG

<sup>4</sup> Department für Pflanzenwissenschaften, Lehrstuhl für Pflanzenzüchtung, TU München, Emil-Ramann-Straße 2, D-85350 FREISING

<sup>5</sup> IMG Laboratorien GmbH, Lochhamer Straße 29, D-82152 MARTINSRIED

<sup>6</sup> vertis Biotechnologie AG, Lise-Meitner-Straße 30, D-85354 FREISING

<sup>7</sup> Max-Planck-Institut für Molekulare Pflanzenphysiologie, Bioinformatik, Am Mühlenberg 1, D-14424 POTSDAM-GOLM

\* Ansprechpartner: Dr. Günther Schweizer, guenther.schweizer@lfl.bayern.de

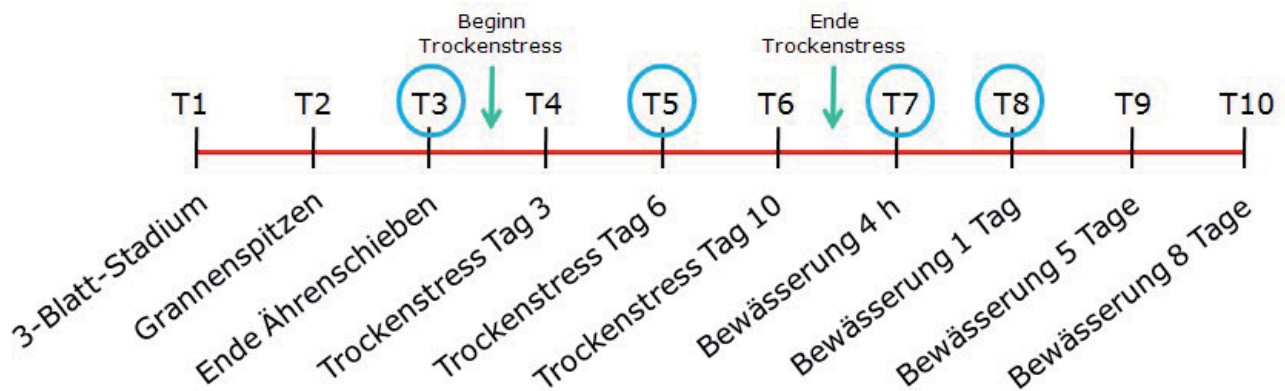


Abbildung 1: Übersicht über die Probenahmezeitpunkte, bezogen auf Entwicklungsstadium und Trockenstressperiode. Die eingekreisten Zeitpunkte wurden für die Gesamt-Transkriptomanalyse verwendet. Beginn und Ende der zwölf-tägigen Trockenstressperiode sind angegeben

Figure 1: Overview about sampling dates referring to developmental stage and drought stress period. Circled sampling dates have been used for the transcriptome analysis. Beginning and end of the drought stress period are indicated.

und der Trockenstressperiode gewählt (Abbildung 1). Jeweils das zweitjüngste Blatt (F-1) von vier Bestockungstrieben wurde abgeschnitten und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Für jeden Beprobungszeitpunkt wurde eine andere Pflanze gewählt.

Um vielversprechende Kandidatengene für weitere Untersuchungen zu identifizieren, wurde zunächst eine Gesamt-Transkriptomanalyse zu ausgewählten Zeitpunkten durchgeführt. Dies geschah parallel mit einem 44k Agilent Microarray (Agilent 2010), und einer 454-Sequenzierung (MARGULIES et al. 2005, WICKER et al. 2006, EMRICH et al 2007), bei welcher alle Gene, die zum Zeitpunkt x in der Pflanze exprimiert sind, quantitativ erfasst werden können. Die bioinformatische Auswertung wird in Zusammenarbeit mit dem MPI für molekulare Pflanzenphysiologie in Golm durchgeführt.

## Ergebnisse

Vor der eigentlichen Auswertung der Daten wurden diese zunächst auf ihre Qualität und Integrität geprüft. So wurde beispielsweise eine Hauptkomponentenanalyse (RINGNÉR 2008) basierend auf den Transkript-Expressionswerten der Proben aus dem Microarray-Experiment durchgeführt (Abbildung 2). Wie erwartet zeigten sich zwei eng beisammen liegende Cluster für die Genotypen Barke und IPZ24727 (Lfl), während das Cluster von Mut6519 deutlich abgegrenzt ist. Dies lässt auf eine saubere Verarbeitung der Proben sowie eine hohe Qualität der Expressionsdaten schließen.

Im nächsten Schritt wurden alle Gene ermittelt, welche im Vergleich Trockenstress-Kontrolle differentiell exprimiert sind. Abbildung 3 gibt beispielhaft am Zeitpunkt T5 die Anzahl der jeweils regulierten Gene des Micrarray-Experimentes wieder. Die linke Seite der Abbildung gibt die Anzahl der Gene mit erhöhter Expression an, die rechte Seite die der Gene mit verminderter Expression.

Auch die Daten der 454-Sequenzierung zeichnen sich durch ihre sehr gute Qualität aus. So konnten je Zeitpunkt und Genotyp ca. 40-50.000 Gentranskripte erfasst und zu Contigs mit einer durchschnittlichen Länge von 850 bp zu-

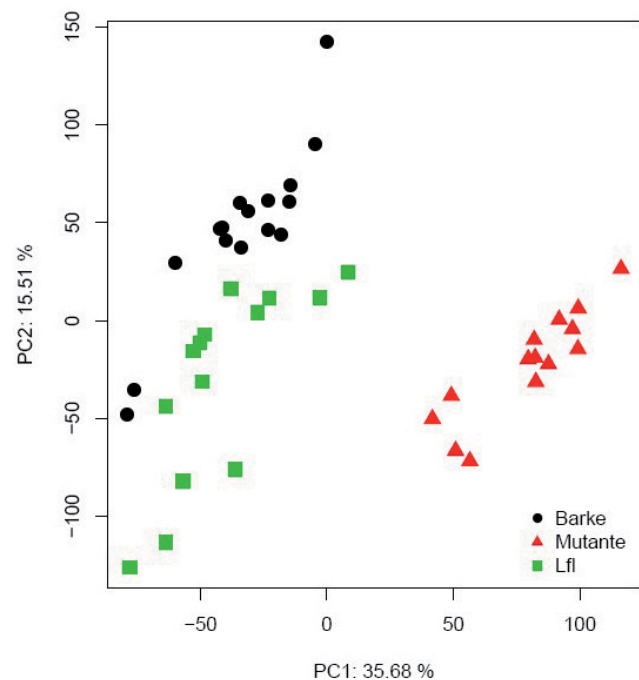


Abbildung 2: Hauptkomponentenanalyse (PCA) der Transkript-Expressionswerte der drei Genotypen. Zur Analyse wurden die normalisierten Signalstärken des Agilent Microarray-Experimentes verwendet. Die Standard-Hauptkomponentenanalyse wurde mit der Statistik-Software R durchgeführt. Die drei ausgewählten Genotypen lassen sich anhand ihres Expressionsmusters deutlich differenzieren.

Figure 2: Principal component analysis (PCA) of transcript expression values of the 3 genotypes. Normalised signal intensities measured in the Agilent array experiments were used for the analysis. A standard principal component (PC) analysis was performed using the R software package for statistical computation. The three genotypes can easily be differentiated by their expression values.

sammengefasst werden, was etwa der Anzahl der zu einem bestimmten Zeitpunkt in einer Zelle aktiven Gene entspricht. Es ist daher davon auszugehen, dass das Transkriptom einfach abgedeckt wurde.

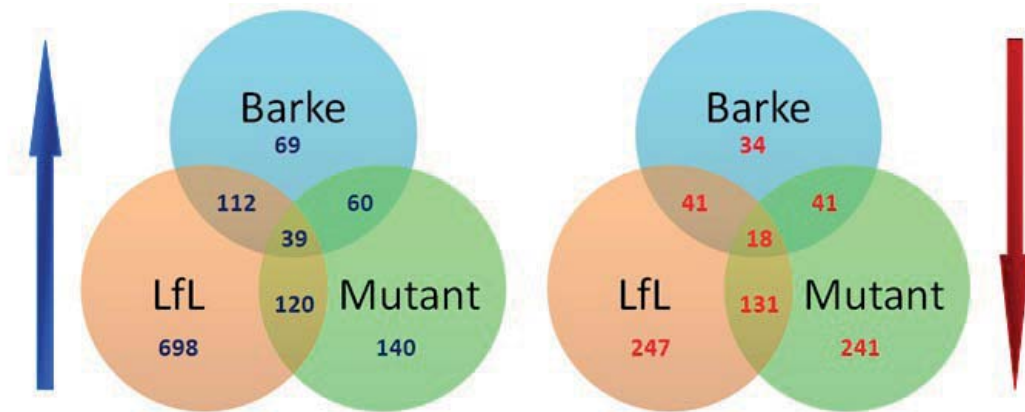


Abbildung 3: Anzahl der Gene, die in den drei Genotypen im Vergleich T5 Trockenstress - T5 Kontrolle spezifisch oder gemeinsam reguliert sind (links hochreguliert, rechts herunterreguliert).

Figure 3: Number of genes which are regulated in one or more of the three genotypes comparing T5 drought stress and T5 control (left upregulated, right downregulated).

## Ausblick

Zurzeit werden die Expressionsdaten beider Ansätze über unterschiedliche Softwareansätze, z.B. MapMan (USADEL et al. 2005) integriert. Darüber sollen die Stoffwechselwege identifiziert werden, welche bei Trockenstress signifikante Aktivitätsunterschiede aufweisen (SREENIVASULU et al. 2008). Desweiteren wurden im Forschungsverbund von den beteiligten Arbeitsgruppen regelmäßig stressrelevante physiologische Parameter erhoben, sowie nach der Ernte Qualitäts- und Ertragsdaten. In einem weiteren Schritt werden die Gen-Expressionsdaten mit diesen erhobenen Daten korreliert. Mittels dieser beiden Ansätze sollen diejenigen Gene identifiziert werden, welche für eine Toleranz gegenüber Trockenstress eine Schlüsselrolle spielen. Diese Gene sollen mittels Real-Time PCR über alle beprobten Zeitpunkte validiert und auf ihre Nutzbarkeit für die praktische Pflanzenzüchtung untersucht werden.

## Literatur

- AGILENT, 2010: Microarray specifications - Barley gene expression [Available online: <http://www.chem.agilent.com/en-US/Products/Instruments/dnamicomicroarrays/barleyoligomicroarraykit/Pages/Barley-oligospecifications.aspx>; accessed 19 Jan 2010].
- CATTIVELLI L, RIZZA F, BADECK FW, MAZZUCOTELLI E, MASTRANGELO AM, FRANCIA E, MARE C, TONDELLI A, STANCA AM, 2008: Drought tolerance improvement in crop plants: An integrated view from breeding to genomics. *Field Crop Res* 105, 1-14.
- EMRICH SJ, BARBAZUK B, Li L, SCHNABLE P, 2007: Gene discovery and annotation using LCM-454 transcriptome sequencing. *Genome Res* 17, 69-73.
- MARGULIES M, EGHOLM M, ALTMAN WE, ATTIYA S, BADER JS, BEMBEN LA, BERKA J, BRAVERMAN MS, CHEN YJ, CHEN Z, DEWELL SB, DU L, FIERRO JM, GOMES XV, GODWIN BC, HE W, HELGESEN S, HO CH, IRZYK GP, JANDO SC, ALENQUER MLI, JARVIE TP, JIRAGE KB, KIM JB, KNIGHT JR, LANZA JR, LEAMON JH, LEFKOWITZ SM, LEI M, LI J, LOHMAN KL, LU H, MAKHIJANI VB, MCDADE KE, MCKENNA MP, MYERS EW, NICKERSON E, NOBILE JR, PLANT R, PUC BP, RONAN MT, ROTH GT, SARKIS GJ, SIMONS JF, SIMPSON JW, SRINIVASAN M, TARTARO KR, TOMASZA, VOGT KA, VOLKMER GA, WANG SH, WANG Y, WEINER MP, YU P, BEGLEY RF, ROTHBERGET JM, 2005: Genome sequencing in open microfabricated high density picoliter reactors. *Nature* 437, 376-380.
- RINGNÉR M, 2008: What is principal component analysis. *Nature Biotechnology* 26, 303-304.
- SREENIVASULU N, USADEL B, WINTER A, RADCHUK V, SCHOLZ U, STEIN N, WESCHKE W, STRICKERT M, CLOSE TJ, STITT M, GRANER A, WOBUS U, 2008: Barley grain maturation and germination: metabolic pathway and regulatory network commonalities and differences highlighted by new MapMan/PageMan profiling tools. *Plant Physiol* 146, 1738-1758.
- USADEL B, NAGEL A, THIMM O, REDESTIG H, BLAESING OE, PALACIOS-ROJAS N, SELBIG J, HANNEMANN J, PIQUES MC, STEINHAUSER D, SCHEIBLE WR, GIBON Y, MORCUENDE R, WEICHT D, MEYER S, STITT M, 2005: Extension of the visualization tool MapMan to allow statistical analysis of arrays, display of corresponding genes, and comparison with known responses. *Plant Physiol* 138, 1195-1204.
- WICKER T, SCHLAGENHAUF E, GRANER A, CLOSE TJ, KELLER B, STEIN N, 2006: Sequencing put to test using the complex genome of barley. *BMC Genomics* 7: 275. DOI 10.1186/1471-2164-7-275.