

ABSTRACT

Single-pass sequencing of randomly chosen cDNA clones is currently the most efficient method for the discovery of many genes from cereals with large genomes. Management and analysis of the enormous amount of low-quality sequence data requires great care and powerful computational methods for annotation. In order to study the network of gene expression underlying seed development during the pre-storage (0 to 4 days after flowering, DAF) and the initial storage phase (6 to 12 DAF) in barley, we employed EST-based macroarrays. Radioactive labelled cDNA probes were prepared from pericarp and post-fertilization embryo sac preparations of developing caryopses (0 –12 DAF) in two-day intervals and hybridized to cDNA macroarrays containing 1412 cDNA inserts, which represent 1184 unique sequences. Grouping of genes by K-mean cluster analysis according to gene expression patterns resulted in 16 gene sets, which can be arranged into 6 cluster groups. Most of the genes up regulated in the pericarp encode proteases, hormonal regulated proteins, and proteins involved in energy production and carbohydrate and lipid metabolism (cluster group1). In the embryo sac probe unique developmental stage specific transcript profiles were identified. During the pre-storage phase, 25% of genes up regulated in embryo sac probe are related to cell division and cell elongation (cluster group 2). In the intermediate phase, photosynthetic genes are up regulated in embryo sac (cluster group3). During the onset of storage phase the embryo sac fraction mainly represents genes belonging to specific metabolic pathways, for instance, the starch (cluster group 4) and storage protein (cluster group 5) biosynthetic pathways including several protease and amylase/trypsin inhibitor genes. On the basis of annotated ESTs and global expression analysis an attempt was made to unravel the complex metabolic and regulatory networks involved during barley seed development. A detailed examination of gene expression patterns related to sucrose to starch and sucrose to pyruvate metabolism pathways provides interesting results of gene networking. Some of the differentially regulated genes detected by expression analysis were studied and further characterized by northern analysis and *in situ* hybridizations.

seg8, a barley mutant defective in seed development, provides a unique opportunity to study the influence of the maternal tissue on endosperm development and storage product accumulation. In order to gain deeper insight into the complex regulatory and metabolic control of maternal and filial tissues and their interaction we analysed *seg8* mutant by expression analysis and metabolite profiling. During pre-storage phase of early caryopsis development no obvious difference were found in seed fresh weight between wild type and

mutant; mutant seeds weighed approximately 43% of normal 'Bowman' wild type during storage phase. Microscopic studies revealed that *seg8* mutant shows massive growth of nucellar projection tissue (maternal) with abnormal shrunken endosperm at 4 days after flowering. The failure of proper endosperm development in *seg8* that was evident already during 4 DAF became a prominent event at 10 DAF onwards with two lobes of endosperm with professed nucellar projection touching the dorsal crease. In the present study we used the 1412 cDNA array to analyse expression of genes involved in different metabolic pathways during early stages of development (2-14 DAF, days after flowering) between 'seg8' mutant and its corresponding wild type 'Bowman'. A comparison of *seg8* versus Bowman during 0-14 DAF at whole caryopsis level as well as in maternal and filial fractions hinted that key genes of carbohydrate metabolism from sugar to starch pathway are down regulated in *seg8* mutant. The results provide evidence that genes encoding the UDP-glucose metabolising enzymes are specifically down regulated in *seg8*. As expected a decrease in the ADP-glucose content was registered in the filial fraction containing endosperm. On the other hand transcripts coding for storage proteins did not yield any considerable differences between mutant and wild type. The reason for maternal inheritance of the abnormal endosperm mutant is not clear, since there is no differences found among transcripts expressed in maternal tissue in the very early stages except at 0 DAF. Characteristic irregularities occur in the endosperm tissue itself with lower expression of carbohydrate metabolic genes immediately before storage activity starts in endosperm. The observed major changes in the expression of starch biosynthetic pathway genes in *seg8* mutant result in less starch accumulation. In addition, we observed decreased transcript levels of some transporters in filial fraction of mutant during 4 to 14 DAF.

Using cDNA macroarray encoding stress genes selected from a barley EST library, we identified transcripts differentially expressed in salt (NaCl)-treated tolerant and sensitive seedlings of foxtail millet. Transcripts of unknown genes and hydrogen peroxide scavenging enzymes such as phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPX) and, additionally, ascorbate peroxidase (APX) and catalase 1 (CAT1) were found to be up regulated during salinity treatment in five-day-old salt-tolerant foxtail millet seedlings (Cv. Prasad). In order to understand the protection mechanism induced in salt-treated tolerant seedlings at the molecular level, we cloned and characterized a foxtail millet cDNA encoding a PHGPX homologue, which shows 85% and 95% homology to one stress-induced member of the small barley PHGPX gene family coding for non-selenium glutathione peroxidases at

the DNA and protein level, respectively. As shown by Southern blot analysis, a small family of PHGPX genes exists in foxtail millet, too. The expression of the PHGPX gene is markedly induced in tolerant seedlings by high salt concentrations, suggesting that its product plays a role in defence against salt-induced oxidative damage. To analyse this process further at the protein level we examined protein expression patterns under various stress conditions. A 25 kD protein was found to be induced prominently under high salt concentrations (250 mM). The salt-induced 25 kD protein has been purified and identified as PHGPX protein based on its peptide sequence. The increase of the PHGPX protein level induced under salt stress conditions only in tolerant seedlings parallels the result found for the PHGPX mRNA in the comparative expression analysis (see above). Most likely, this non-selenium glutathione peroxidase is one of the components conferring resistance against salt to the tolerant foxtail millet cultivar. The tolerant five-day-old seedlings grown during high salinity treatment (200 mM NaCl) contained a lower amount of Na⁺ ions and showed a lower electrolyte leakage than sensitive seedlings. In conclusion, our comparative studies indicate that at least in part, salt-induced oxidative tolerance is conferred by an enhanced compartment specific activity of antioxidant enzymes (Sreenivasulu *et al.*, 2000).

Zusammenfassung

Gegenwärtig ist die Sequenzierung großer Cerealien-Genome vor allem aus Kostengründen nicht möglich. Eine effiziente alternative Methode zur Identifizierung von Genen ist die unidirektionale Sequenzierung zufällig ausgewählter cDNA-Klone. Die enorme Anzahl und die Qualitätsmängel der entstehenden Primärsequenzen (ESTs – Expressed Sequences Tags) erfordern während des Annotationsprozesses sorgfältige Analysen unter Verwendung leistungsfähiger Software.

Die Entwicklung von Gerstensamen wird durch Netzwerke von Genexpressionsprogrammen gesteuert. cDNA-Makroarray-Filter, basierend auf Karyopsen-spezifischen ESTs, wurden verwendet, um Genexpressionsprogramme während der Vorspeicher- (0 – 4 Tage nach der Blüte, Days After Flowering, DAF) und der Speicherphase der Gerstensamen (6 – 12 DAF) zu analysieren. Zur cDNA-Makroarray-Analyse wurden Filter mit 1412 cDNA-Inserts (repräsentieren 1184 unikale Sequenzen) mit radioaktiv markierten cDNA-Proben hybridisiert. Zur Amplifikation der cDNA wurde mRNA verwendet, die in 2-Tages-Abständen sowohl aus dem maternalen als auch aus dem filialen Teil des sich entwickelnden Gerstenkorns isoliert wurde. Die Anwendung der *K mean* Cluster Analyse auf die Expressionsanalyse-Ergebnisse ergab 16 Gruppen von Genen (Cluster) mit ähnlichem Expressionsprofil, die in 6 Clustergruppen zusammengefaßt werden können. Gene mit höherer Expression im maternalen Teil des Korns (*cluster group 1*) codieren Proteasen, hormonell regulierte Proteine und Proteine, die Funktionen in Energieproduzierenden Prozessen und im Kohlehydrat- und Lipid-Metabolismus besitzen. Den filialen Teil des Korns charakterisieren für das Entwicklungsstadium spezifische Expressionsprofile. 25% der während der Vorspeicherphase hochregulierten Gene können mit Zellteilungs- und -streckungsprozessen in Verbindung gebracht werden (*cluster group 2*). In der intermediären Phase (8 – 10 DAF) hochexprimierte Gene codieren für Photosynthese-assoziierte Genprodukte (*cluster group 3*). Zu Beginn der Speicherphase werden in der filialen Fraktion Gene exprimiert, deren Produkte spezifischen Biosynthesewegen zugeordnet werden können, so z.B. der Akkumulation von Stärke (*cluster group 4*) und Reserveproteinen (*cluster group 5*) sowie der Expression von Genprodukten, die den Abbau der Speicherstoffe verhindern (verschiedene Protease- und Amylase/Trypsin-Inhibitoren). Ausgehend von der Annotation der ESTs und der Gesamtheit der Expressionsanalyse-Ergebnisse wurde

der Versuch unternommen, das komplexe Netzwerk von Regulations- und Biosynthesewegen während der Gerstensamen-Entwicklung im Zusammenhang darzustellen. Die detaillierte Auswertung der für den Stärkebiosynthese- und Glykolyse-Stoffwechselweg spezifischen Genexpressionsprofile ergab interessante Ergebnisse in Bezug auf das Netzwerk der Genexpression. Einige der differentiell exprimierten Gene wurden mittels Northernblotting und *in situ*-Hybridisierung näher untersucht, auch um die Ergebnisse der Expressionsanalyse zu bestätigen.

Seg8, eine Mutante mit Defekten in der Endospermentwicklung des Gerstenkorns, bietet exzellente Möglichkeiten, den Einfluß der maternalen Gewebe auf Endosperm-Entwicklung und Speicherstoff-Akkumulation zu untersuchen. Um die komplexe regulatorische und metabolische Wechselwirkung zwischen maternalen und filialen Geweben näher zu untersuchen, wurden für die Samenentwicklung der Mutante *seg8* Expressions- und Metabolitprofile erstellt. Während der Vorspeicherphase wurden keine Unterschiede im Frischgewicht der Mutanten- und Wildtypsamen gefunden. Jedoch zeigten mikroskopische Untersuchungen einen verzögerten Abbau des Nucellus-Gewebes und einen abnormen Aufbau der nucellaren Projektion (beide Gewebe sind maternalen Ursprungs) während der frühen Entwicklung (2 – 4 DAF) der Mutantenkörner. Abweichungen von der normalen Endospermentwicklung sind bereits 4 DAF nachweisbar, werden jedoch 10 DAF deutlich sichtbar anhand der Ausbildung zweier Endospermhälften, die von der nucellaren Projektion getrennt werden, die den gegenüberliegenden Rückenbereich des Korns berührt. In dieser Arbeit wurde der 1440 cDNA-Fragmente enthaltende Makroarray-Filter benutzt, um Genexpressionsprogramme verschiedener Biosynthesewege während der frühen Entwicklung (2 – 14 DAF) von Mutanten- und Wildtyp-Körnern vergleichend zu untersuchen. Sowohl bei der Verwendung von ganzen Körnern als auch bei der Analyse der maternalen und filialen Fraktion zeigte sich, dass die Expression der Schlüsselgene des Stärke-Biosyntheseweges in *seg8* auf einem niedrigeren Niveau erfolgt als im Wildtyp „Bowman“. Besonders die Expression der UDP-Glukose metabolisierenden Enzyme ist in *seg8* reduziert. Wie erwartet, konnte eine Erhöhung des ADP-Glukosegehaltes in der filialen Fraktion der Mutantenkörner nachgewiesen werden. Jedoch unterscheidet sich die Transkription der Speicherprotein-Gene in *seg8* und Wildtyp-Körnern nicht. Die maternale Vererbung des *seg8*-Phänotyps kann auf der Grundlage der bisher vorliegenden Ergebnisse nicht erklärt werden. Die

Expressionsanalyse zeigte keine Unterschiede in den Transkriptmengen, die während der Bestäubung (0 DAF) in den maternalen Geweben von *seg8* und Wildtyp exprimiert werden. Charakteristisch ist die Verringerung der Expression der Gene des Kohlenhydratmetabolismus unmittelbar vor Beginn der Stärkeakkumulation im Endosperm der Mutantenkörner. Die beobachtete Verringerung der Expressionsraten führt zu einer Verringerung der Stärkeakkumulation. Weiterhin konnte eine Verringerung der Expression mehrerer für Transport-Proteine codierenden Gene in der filialen Fraktion der Mutantenkörner nachgewiesen werden.

Unter Verwendung eines Makroarray-Filters, der für Stress-Gene codierende cDNA-Fragmente aus einer Gersten-cDNA-Bank enthielt, wurden Transkripte identifiziert, die differentiell in Salz-toleranten und -sensitiven Varietäten der Fuchsschwanz-Hirse (*Setaria italica* L.) unter NaCl-Stress exprimiert werden. Transkripte unbekannter Gene und Wasserstoffperoxid-abbauender Enzyme, wie z.B. Phospholipid Hydroperoxid Glutathion Peroxidase (PHGPX), Ascorbat Peroxidase (APX) und Katalase 1 (CAT1) wurden in der 5-Tage-alten Keimlingen der toleranten Varietät (Cv. Prasad) unter Salz-Stress in erhöhter Menge nachgewiesen. Um den unter Salz-Stress in den toleranten Keimlingen initiierten Abwehrmechanismus auf molekularer Ebene zu verstehen, wurden cDNAs aus Fuchsschwanz-Hirse isoliert und charakterisiert, die für ein PHGPX-Homologes codieren. Die cDNA zeigt 85% (DNA) und 95% Homologie (Protein) zu einem Mitglied einer kleinen Stress-induzierten PHGPX-Genfamilie aus Gerste, die für nicht-Selen Glutathion Peroxidasen codiert. Mittels Southernblot-Analyse konnte gezeigt werden, dass auch in Fuchsschwanz-Hirse eine kleine Genfamilie existiert. Die Expression des PHGPX-Gens wird unter Salz-Stress in den Keimlingen der toleranten Varietät deutlich induziert, woraus abgeleitet werden kann, dass das Genprodukt eine Rolle in der Abwehr der Salz-induzierten oxidativen Zerstörung spielt. Um diesen Prozess auch auf Protein-Ebene zu verstehen, wurden Protein-Expressionsmuster unter verschiedenen Stress-Bedingungen untersucht. Bei hohen Salzkonzentrationen (250 mM) wurde besonders ein 25 kD-Protein induziert. Dieses Protein wurde gereinigt und anhand seiner Peptid-Sequenz als PHGPX identifiziert. Die Erhöhung der Konzentration des PHGPX-Proteins unter Salz-Stress in Keimlingen der toleranten Varietät entspricht der für die PHGPX-mRNA in der vergleichenden Expressionsanalyse nachgewiesenen Expressionserhöhung. Wahrscheinlich ist diese

nicht-Selen Glutathion Peroxidase eine der Komponenten, die in Fuchsschwanz-Hirse Resistenz gegen Salz vermittelt. Die 5-Tage-alten Keimlinge der toleranten Varietät, die unter Salz-Stress (200 mM) angezogen wurden, enthielten geringere Na⁺-Mengen und zeigten einen geringeren Elektrolyt-Verlust als sensitive Keimlinge unter vergleichbaren Bedingungen. Gemeinsam mit bereits publizierten Ergebnissen (Sreenivasulu et al., 2000) zeigen diese Untersuchungen, dass Toleranz gegen Salz-induzierten oxidativen Stress durch eine verstärkte Kompartiment-spezifische Aktivität antioxidativer Enzyme vermittelt wird.