

DISS. ETH NO. 21699

**MORPHOLOGICAL, PHYSIOLOGICAL AND MOLECULAR
CHARACTERIZATION OF DROUGHT TOLERANCE IN CASSAVA
(*MANIHOT ESCULENTA* CRANTZ)**

A thesis submitted to attain the degree of

DOCTOR OF SCIENCES of ETH ZURICH

(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by

Charles Ochieng' Orek (BSc, MSc)

MSc in Crop Protection

University of Nairobi

born on 12. 06.1979

citizen of Kenya

accepted on the recommendation of:

Prof. Dr. Wilhelm Gruissem, examiner

Dr. Hervé Vanderschuren, co-examiner

Dr. Morag Ferguson, co-examiner

2014

Overall Abstract

Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) is inherently drought tolerant. Nevertheless, substantial genotypic variation exists for this trait. Characterization of these morphological, physiological and molecular differences establish an essential foundation for future development of drought associated molecular markers for cassava. In the present study, multi-seasonal and locational field-based drought trials were carried out in Kenya with the purpose of identifying drought tolerant and drought susceptible cassava genotypes. These were then subjected to further physiological and molecular characterization under controlled water deficit assays at ETH-Zurich, Switzerland.

Field drought stress generally reduced cassava vegetative growth and productivity. In addition to other phenotypic parameters, storage root fresh weight was used as a primary criterion to discriminate between drought tolerant and drought susceptible genotypes. Selected drought tolerant cassava genotypes were M98/0068, 94/0039, 95/0306, 98/0002 and I92/0067, while drought susceptible genotypes comprised PYT, 92/0427, TME-419, I96/1439 and 96/0409. Under water deficit treatment across seasons and regardless of the locations, tolerant candidates bulked above average fresh root weight, whereas susceptible candidates performed below average. Field data also showed significant and positive correlations between root yield, harvest index, number of storage roots and above ground biomass but not leaf retention.

The genotypes were physiologically assessed under controlled water deficit assays through stomatal conductance (Gs). More pronounced Gs decrease was observed from one tolerant (94/0039) and two susceptible (TME-419 and 92/0427) genotypes, lower Gs decrease recorded from susceptible I96/1439, while tolerant 98/0002, I92/0067, M98/0068 and 95/0306 generally showed moderate Gs decrease. Cessation of leaf Gs after 10 days of water deficit (WD) and increased Gs rates after 1 day of re-watering (WDR) treatments respectively mimicked drought-induced stomatal closure and stomatal re-opening. Thus we hypothesized drought avoidance mechanism in cassava.

Genes with roles or functions in molecular pathways such as phosphatidic acid biosynthesis (*PLD α 1*, *ABI1*, *GPA1*), positive and negative regulators of ABA-induced stomatal closure in

guard cells (*KAT1*, *ERA1*, *PYR1*, *Aquaporins*, *PLD α 1*, *ABI1*), polyamine biosynthesis (*ADC2*), transcription factors (TFs) involved in ABA signalling and stomatal movement (*MYB44*, *MYB60*, *NFYA5*), Calceosin biosynthesis (*RD20/AtCLO3*) and other transcription factors (*NAC002* and *ABF2*) were selected from literature reviews. Using RT-qPCR, mathematical model developed by Pfaffl (2001) and Student Paired Sample *t*-test, the relative expression profiles of these genes were evaluated from three biological replicates of two drought tolerant (94/0039 & 95/0306) and two drought susceptible (196/1439 & 92/0427) cassava genotypes subjected to well-watered (WW), WD and WDR treatments.

The set of genes that showed consistent differential regulation between tolerant and susceptible cassava genotypes under WD and WDR could provide further molecular insights into cassava's drought response and subsequent recovery from the effects of drought, were *ABI1*, *GPA1*, *Aquaporin (RWC3)*, *MYB44* and *MYB60*. Other genes such as *PLD α 1*, *PYR1*, *ADC2*, *ATAF1*, *RD20*, *NFYA5* and *ABF2* exhibited discrepant or inconsistent expression between treatments and cassava genotypes.

Genes that provide insights into pathways regulating stomatal function may be used to produce plants with enhanced water-usage efficiency, maintain high yield and drought tolerance (Wang et al., 2007; Cominelli et al., 2010). Most of the genes we characterized in this project were involved in stomatal aperture movement. In general, the genes could primarily be used to interpret tolerance to drought or water stress in tolerant cassava genotypes. Further gene validation through genetic engineering or mutants would be required to conclude on their contribution to drought tolerance trait in cassava.

Zusammenfassung

Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) ist von Natur aus trockentolerant, trotzdem existiert eine beträchtliche genotypische Variation für diese Eigenschaft. Die Charakterisierung von morphologischen, physiologischen und molekularen Unterschieden bildet eine wesentliche Grundlage für die zukünftige Entwicklung von molekulare Markern für Trockentoleranz in Cassava. Zur Identifizierung von trockentoleranten und –anfälligen Cassava Genotypen wurden multi-saisonale und -lokale Feldversuche in Kenia durchgeführt. Ausgewählte Genotypen wurden zur weiteren physiologischen und molekularen Charakterisierung unter

kontrollierter Defizitbewässerung an der ETH Zürich untersucht. Sämtliche Cassava Genotypen stammen von IITA, Ibadan, Nigeria.

Trockenstress im Feld führte grundsätzlich zu reduziertem vegetativem Wachstum und verminderter Produktivität. Zusätzlich zu anderen phänotypischen Parametern wurde das Frischgewicht der Speicherwurzel als primäres Kriterium zur Unterscheidung von trocken tolerantanten und –anfälligen Genotypen verwendet. Ausgewählte trocken tolerantante Cassava Genotypen sind M98/0068, 94/0039, 95/0306, 98/0002 und I92/0067, während Genotypen PYT, 92/0427, TME-419, I96/1439 und 96/0409 als trocken anfällige Genotypen identifiziert wurden.

Tolerante und anfällige Genotypen produzierten grundsätzlich über- bzw. unter durchschnittlich viel Speicherwurzeln (Frischgewicht) bei Wasserdefizit, unabhängig vom Standort. Die Felddaten zeigten zudem signifikante und positive Korrelationen zwischen Wurzelertrag und Ernteindex, Anzahl Speicherwurzeln und oberirdischem Ertrag, jedoch nicht zwischen Wurzelertrag und Blatt Retention und Pflanzengröße.

Zum Nachweis von Trockentoleranz- oder Trockenvermeidungsmechanismen in Cassava wurden 3 tolerantante (98/0002, 95/0306 & 94/0039) und 3 anfällige (92/0427, I96/1439 & TME-419) Genotypen auf deren stomatäre Leitfähigkeit untersucht und deren unterschiedliche Genexpressionsmuster charakterisiert. Die Genotypen 95/0306 und 98/0002 zeigten eine höhere bzw. tiefere stomatäre Leitfähigkeit als andere Genotypen im Trockenversuch. Anhand der genotypischen Variation für stomatäre Leitfähigkeit und Evapotranspiration (Bodenfeuchte) wurde eine Prozedur zur Probenahme von Blättern entworfen. Aus den geernteten Blättern wurde RNA extrahiert, cDNA synthetisiert und RT-qPCR zur Quantifizierung der relative Genexpression angewendet.

Die in der Literatur beschriebene Gene waren hauptsächlich solche mit Funktionen in Trockenheitsreaktionen, Signalwirkung von Phytohormonen (ABA), Polyamin Synthese, negative und positive Regulation von ABA-vermittelten Stomatabewegungen und Transkriptionsfaktoren, die in Stomatakontrolle unter Trockenheit involviert sind. Im tolerantanten Genotyp 94/0039 war ABI1, der negative Regulator von ABA-vermittelter Stomataschliessung, bei Wasserdefizit (WD) stark runterreguliert und hochreguliert bei

anschliessender Bewässerung. GPA1, der positive Regulator von ABA-vermittelter Inhibition der Stomataöffnung, war in beiden anfälligen Genotypen (I96/1439 & 92/0427) signifikant runterreguliert und in 94/0039 bei WD hochreguliert. PLD α 1 war nicht unterschiedlich reguliert zwischen den untersuchten Genotypen und konnte nicht zur Differenzierung von Genotypen verwendet werden.

Genotyp 94/0039 zeigte eine signifikante Runterregulation von PYR1 und ABI1 bei WD und Hochregulation bei anschliessender Bewässerung. ERA1 war signifikant hochreguliert in 94/0039, unterstützt somit möglicherweise die Stomataöffnung bei WD. Weil ERA1 bei WD mit anschliessender Bewässerung in den meisten Genotypen hochreguliert war, wird von einer Hemmung der ABA-vermittelten Stomataschliessung ausgegangen. KAT1 war bei WD in keinem Genotyp reguliert, jedoch hochreguliert im anfälligen Genotyp I96/1439 bei anschliessender Bewässerung. Aquaporine, welche die Wasser- und CO₂ Diffusion in die Zelle kontrollieren, waren hochreguliert in Genotypen mit hoher stomatärer Leitfähigkeit (95/0306) bei WD und runterreguliert bei anschliessender Bewässerung. Die Regulation von NFYA5 war inkonsistent zwischen Genotypen und Behandlungen. AtMYB44 war bei WD in 94/0039 signifikant hochreguliert und runterreguliert in I96/1439.

MYB60 war nur in 95/0306 bei WD runterreguliert, was auf eine mögliche Verminderung der Stomataöffnung hindeutet. ADC2 war in 95/0306 und 92/0427 signifikant hochreguliert, in I96/1439 runterreguliert und nicht exprimiert in 94/0039 bei sehr tiefer Feuchtigkeit und stomatärer Leitfähigkeit. Bei WD wurde in den meisten Genotypen eine signifikante Überexpression von RD20 beobachtet. ATAF1 ist bei WD im toleranten Genotyp 94/0039 hochreguliert und in allen anderen Genotypen nicht exprimiert. Unter geringem Wasserdefizit war ABF2 in allen Genotypen signifikant überexprimiert. Die hier zusammengefasste Liste von differentiell regulierten Genen bietet molekulare Einblicke in die Trockenheitsreaktion von Cassava sowie die darauf folgende Erholung von den Trockenheitseffekten auf molekularer Ebene. Primär können die beschriebenen Gene zur Interpretation von Trockenheitstoleranz oder Wasserstress in toleranten und anfälligen Genotypen verwendet werden.