

**Die Analyse der trockenstress-induzierten Blattseneszenz
unter Nutzung verschiedener
Hordeum vulgare Kultivare**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der
Naturwissenschaftlichen Fakultät I – Biowissenschaften –
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von
Sandra Böhme

geb. am 02. April 1986 in Greiz

Gutachter 1: Prof. Dr. Klaus Humbeck

Gutachter 2: Prof. Dr. Nicolaus von Wirén

Gutachter 3: Prof. Dr. Uwe Ludewig

Tag der öffentlichen Promotionsverteidigung: 01.11.2018

Inhaltsverzeichnis

I	Zusammenfassung	1
I	Summary	3
II	Einleitung	5
2.1	Anlass und Aktualität.....	5
2.2	Ursprungs- und Verbreitungsgebiete der Gerste.....	5
2.3	Genpool der Gerste (<i>Hordeum</i>).....	7
2.4	Gerste als Modellorganismus für die Forschung.....	8
2.5	Trockenstress – ein limitierender Faktor für die Landwirtschaft.....	8
2.6	Die trockenstress-induzierte Blattseneszenz	9
2.6.1	Trockenstress induziert Seneszenz-Prozesse	9
2.6.2	Pflanzen reagieren auf Trockenstress	10
2.6.3	Transkriptionsfaktoren (TF).....	11
2.6.4	Polyamine	14
III	Zielsetzung	16
IV	Ergebnisse	17
4.1	Einfluss von Trockenstress auf Jungpflanzen verschiedener <i>Hordeum vulgare</i> -Kultivare.....	17
4.2	Tadmor vs. Scarlett – vergleichende Analyse unter Trockenstress-Bedingungen	18
4.2.1	Physiologische Charakterisierung der trockenstress-induzierten Blattseneszenz	18
4.2.1.1	Dokumentation des verzögerten trockenstress-induzierten Seneszenz-Phänotyps von Tadmor	18
4.2.1.2	Analyse der PSII-Effizienz und des relativen Chlorophyllgehaltes	20
4.2.2	Vergleichende Genexpressionsanalysen in Scarlett und Tadmor.....	22
4.2.2.1	Analyse der Expression der Marker-Gene <i>HvS40</i> , <i>HvA1</i> , <i>HvDhn1</i> und <i>HvHsp17</i> ..	22
4.2.2.2	Vergleichende Microarray-Analysen in Scarlett und Tadmor.....	24
4.2.3	Vergleichende Genexpressionsanalysen ausgewählter Gengruppen.....	32

4.2.3.1	Transkriptionsregulatoren (TR)	32
4.2.3.2	Polyamine (PA)	43
4.2.4	Validierung der Microarray Daten.....	47
V	Diskussion	48
5.1.	Trockenstress-System.....	48
5.2	Die trockenstress-induzierte Blattseneszenz in Scarlett und Tadmor	49
5.2.1	Physiologische Veränderungen in Scarlett und Tadmor unter Trockenstress- bedingungen.....	49
5.2.2	Expression der Marker-Gene <i>HvA1</i> , <i>HvS40</i> , <i>HvDhn1</i> und <i>HvHsp17</i> in Scarlett und Tadmor unter Trockenstressbedingungen	50
5.3	Kandidaten-Gene der trockenstress-induzierten Blattseneszenz.....	52
5.3.1	Transkriptionsregulatoren.....	52
5.3.1.1	Ein Jumonji-TR (<i>AtJMJD5/JMJ30</i>) ist in Scarlett und Tadmor unter Trockenstress induziert.....	53
5.3.1.2	Ein bZIP-TR (<i>AtHY5</i>) ist nur in Scarlett unter Trockenstress induziert	53
5.3.1.3	Ein GRAS-TR (<i>AtSCL14</i>) ist nur in Tadmor unter Trockenstress induziert	54
5.3.1.4	ARR-TR sind unter Trockenstress in Tadmor und Scarlett reprimiert.....	55
5.3.1.5	Ein MYB-related-TR (<i>AtRL5</i>) ist unter Trockenstress in Scarlett reprimiert	56
5.3.2	Polyamine	56
VI	Material und Methoden	59
6.1	Material	59
6.1.1	Pflanzenmaterial.....	59
6.1.2	Chemikalien	61
6.1.3	Puffer, Lösungen, Medien	62
6.1.4	Biochemische Materialien	63
6.1.4.1	Enzyme	63
6.1.4.2	Oligonukleotide	63

6.1.4.3	Kit's	64
6.2	Methoden	65
6.2.1	Pflanzenanzucht und Saatgutvermehrung	65
6.2.1.1	Pflanzenanzucht	65
6.2.1.2	Saatgutvermehrung	65
6.2.2	Trockenstress-Experimente auf Erde	65
6.2.2.1	Trockenstress-Testsystem	65
6.2.2.2	Trockenstress-Stadien und Probennahme	66
6.2.3	Physiologische Untersuchungen	66
6.2.3.4	Messung der Chlorophyll-Fluoreszenz (PSII-Effizienz)	66
6.2.3.5	Messung des relativen Chlorophyllgehaltes	67
6.2.4	Molekulargenetische Methoden	67
6.2.4.1	Isolation von Gesamt-RNA aus <i>Hordeum vulgare</i>	67
6.2.4.2	Photometrische Konzentrationsbestimmung der RNA	68
6.2.4.3	Agarose-Gelelektrophorese	69
6.2.4.4	DNaseI-Verdau	69
6.2.4.5	cDNA-Synthese	70
6.2.4.6	Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR)	71
6.2.4.7	Berechnung der PCR-Effizienz (E)	73
6.2.4.8	Berechnung der relativen Expressionslevel: delta-delta Ct ($\Delta\Delta Ct$)-Methode	73
6.2.4.9	Microarray-Analysen	74
6.2.4.10	Verifizierung der Kandidaten-Gene	75
VII	Literaturverzeichnis	76
VIII	Abkürzungsverzeichnis	90
IX	Abbildungsverzeichnis	92
X	Tabellenverzeichnis	94

I Zusammenfassung

Trockenstress beeinträchtigt Wachstums- und Entwicklungsprozesse von Pflanzen. Besonders bei Gerste (*Hordeum vulgare*) und anderen Getreidearten führen langanhaltende Wassermangelbedingungen zu massiven Ernteverlusten. Dabei ist die Angepasstheit einzelner Sorten an Trockenstress je nach Herkunft ganz unterschiedlich.

Die vorliegende Arbeit untersucht den Einfluss von Trockenstress auf verschiedene Kultivare von *Hordeum vulgare*. Mit Hilfe eines Test-Systems wurde zunächst die Reaktion auf Trockenstress an Jungpflanzen einiger Wildformen, Elitesorten und Landrassen von Gerste untersucht. Dabei zeigten zwei Kultivare extreme Unterschiede hinsichtlich ihrer Trockentoleranz. Tadmor wurde als sehr trockentolerantes Kultivar und Scarlett als sehr trockenempfindliches Kultivar identifiziert und für alle weiteren Analysen der trockenstress-induzierten Blattseneszenz ausgewählt. Im weiteren Verlauf erfolgte die Untersuchung der Trockenstress-Antwort beider Kultivare zu definierten Zeitpunkten des Stressverlaufs. Dabei wurden sowohl sichtbare Stress-Symptome dokumentiert, als auch physiologische Messungen der PSII-Effizienz und des relativen Chlorophyllgehaltes an den Primärblättern der Kontroll- und Trockenstress-Pflanzen durchgeführt. Erwartungsgemäß konnte der frühzeitige Abfall der Stress-Parameter im trockenempfindlichen Kultivar Scarlett bestätigt werden und spiegelt die verzögerte trockenstress-induzierte Blattseneszenz im trockentoleranten Kultivar Tadmor wider. Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde die frühe Trockenstress-Antwort beider Kultivare auf molekularer Ebene analysiert. Die Regulation der Marker-Gene für Trockenstress (*HvA1*) und Seneszenz (*HvS40*) belegen ebenfalls die verzögerte trockenstress-induzierte Blattseneszenz von Tadmor gegenüber Scarlett. Auf der Grundlage dieser Ergebnisse wurden im Anschluss mittels Microarray-Analysen alle durch Trockenstress differentiell regulierten Gene in Scarlett und Tadmor erfasst, klassifiziert und statistisch evaluiert. Einige Gengruppen, wie z.B. Gene der Photosynthese, des Redoxsystems und der Transportprozesse sind ähnlich reguliert, wohingegen Gene, die in Degradationsprozesse, Entwicklungsprozesse und der abiotischen Stressantwort involviert sind, in beiden Kultivaren verschieden reguliert sind. Im weiteren Verlauf der Arbeit wurden zwei Gengruppen näher analysiert. In der ersten Gengruppe der Transkriptionsregulatoren wurden zunächst alle differentiell regulierten Gene nach ihrem Expressionsmuster im Trockenstress-Verlauf in Cluster sortiert. Folgende Kandidaten-Gene der jeweiligen Genfamilie wurden für jedes Cluster identifiziert überprüft:

AtJMJD5/JMJ30 (Jumnonji), *AtHY5* (bZIP), *AtSCL14* (GRAS) und *AtRL5* (MYB-related). Die zweite Gruppe umfasst die funktionelle Gengruppe der Polyamine. Dabei sind interessanterweise Gene der Polyamin-Oxidasen in Tadmor leicht induziert. Weitere Gene des Polyamin-Metabolismus, z.B. *HvADC*, *HvSAMDC*, *HvSPDS* und *HvSPMS*, sind in beiden Kultivaren verschiedenen reguliert. Die Expressionsmuster der identifizierten Kandidatengene in Scarlett und Tadmor und damit ihre mögliche Funktion in der Ausbildung der Trockentoleranz werden in der vorliegenden Arbeit diskutiert.

I Summary

Growth and development processes of plants are highly affected by drought stress. Long-term drought conditions lead to massive loss of yield especially for barley (*Hordeum vulgare*) and other crop plants. Thereby the adaption of individual species to drought is very different depending on their origin.

The present study investigates the influence of drought stress on different cultivars of *Hordeum vulgare*. In a first step the drought response of certain wild forms, elite varieties and landraces of barley was analysed using a test system for drought stress. Two cultivars showed extreme differences in relation to drought tolerance. The cultivar Tadmor was determined as drought tolerant and Scarlett as drought sensitive. These two cultivars were selected for all further analyses of the drought stress-induced leaf senescence. The stress response of Scarlett und Tadmor was then investigated at defined stages in the time course of drought stress. In detail, visible stress symptoms were documented and physiological measurements of the PSII-efficiency and the relative chlorophyll content were carried out at the primary leaves of control and drought stressed plants. As expected, these stress parameters began to decline earlier in the drought sensitive cultivar Scarlett, which in turn clarifies the delay of drought stress-induced leaf senescence in Tadmor. In the next step, the early drought stress response was analysed on the molecular level in both cultivars. The regulation of marker genes for drought stress (*HvA1*) and senescence (*HvS40*) also confirmed the delayed drought stress-induced leaf senescence of Tadmor in comparison to Scarlett. Based on these results, microarray analyses revealed a set of differentially regulated genes in Scarlett and Tadmor during drought stress, which were then classified and statistically evaluated. Some genes, like photosynthesis genes, genes of the redox system and transport processes are similar regulated in both cultivars. Whereas genes, which are involved in degradation processes, developmental processes and abiotic stress response, are different regulated in Scarlett and Tadmor.

Further analyses focused on two groups of genes. First group are genes coding for transcription regulators. These genes were clustered according to their expression pattern in the time course of drought stress and following candidate genes were identified and verified for each cluster: homologues genes of *AtJMJD5/JMJ30* (Jumnonji), *AtHY5* (bZIP), *AtSCL14*

(GRAS) and *AtRL5* (MYB-related). Second group of genes contains the functional genes of the polyamine family.

Interestingly, two genes coding for polyamine oxidases are slightly induced in Tadmor. Other genes of the polyamine-metabolism, like *HvADC*, *HvSAMDC*, *HvSPDS* and *HvSPMS* are differentially regulated in both cultivars. The expression pattern of all these identified candidate genes in Scarlett and Tadmor and thus their possible function in the development of drought tolerance will be discussed in this study.

II Einleitung

2.1 Anlass und Aktualität

Im Jahre 2050 werden voraussichtlich 9 Mrd. Menschen auf dieser Erde leben (GODFRAY *et al.*, 2010). Nach Schätzungen der FAO (*Food and Agriculture Organization of the United Nations*) wird gleichzeitig die globale Nachfrage um Nahrungs- und Futtermittel um 70% ansteigen (FAO, 2009). Diesem Trend stehen jedoch die aktuellen Prognosen der zunehmenden Erderwärmung entgegen. Mit einem kontinuierlichen Anstieg der weltweiten Emissionen steigt Berechnungen zufolge die globale Durchschnittstemperatur bis zum Ende des 21. Jahrhunderts um 2,6 bis 4,8°C an (IPPC - *Intergovernmental Panel on Climate Change*, 2015). Wasserknappheit, Hitzewellen und Dürreperioden, gefolgt von massiven Ernteverlusten sind die globalen Konsequenzen.

LESK *et al.*, 2016 analysierten diese Wetterextreme im Zeitraum von 1964 bis 2007 und stellen fest, dass in betroffenen Ländern die jährliche Getreideproduktion um 9-10% abnahm. Während extreme Hitze den Ertrag lediglich verringerte, zeigen diese Autoren weiterhin, dass Trockenphasen viele Pflanzen komplett zerstörten und ganze Anbauflächen lahmlegten. Ein Lösungsansatz verfolgt die Verbesserung der Fähigkeiten von Getreidepflanzen sowohl Qualität, als auch Ernteertrag unter Wassermangelbedingungen aufrechtzuerhalten (GODFRAY *et al.*, 2010).

Aus diesem Grund ist in der klassischen Getreidezüchtung die Trockenresistenz inzwischen eines der wichtigsten Zuchtziele. Dabei liegt der Schlüssel zur Trockenresistenz der Pflanzen in ihrem Erbgut. Gerste (*Hordeum vulgare*) ist die weltweit viertwichtigste Getreideart (<http://faostat.fao.org>) und wird in der Lebensmittel- und Futtermittelindustrie verwendet. Landrassen von *Hordeum vulgare* sind an die harsche Umwelt, in welcher sie leben, bestens angepasst. Das macht sie zu interessanten Untersuchungsobjekten für die Identifizierung von Genen, welche in der Ausbildung der Trockenresistenz involviert sind. Landrassen liefern somit wichtige genetische Ressourcen zur Entwicklung trockentoleranter Sorten.

2.2 Ursprungs- und Verbreitungsgebiete der Gerste

Das Ursprungsgebiet der Gerste befindet sich in der Region des sogenannten „Fruchtbaren Halbmondes“ und führt vom heutigen Israel über Jordanien, Libanon, West-Syrien, der südöstlichen Türkei, bis hin zum Irak sowie dem Westen Irans (SALAMINI *et al.*, 2002).

Archäologische Funde in dieser Region ergaben, dass vor etwa 10.000 Jahren die Wildform der Gerste, *Hordeum vulgare* ssp. *spontaneum* (C. Koch) Thell., im Folgenden *Hordeum spontaneum* genannt, domestiziert wurde (ZOHARY, HOPF & WEISS, 2012). Das primäre Domestikationszentrum vermuten BADR *et al.*, 2000 in der Region um Israel und Jordanien. Von dort aus breitete sich *Hordeum spontaneum* möglicherweise in weiteren Gebieten des „Fruchtbaren Halbmondes“ sowie der Ägäisregion, dem Iran und der Himalaya-Region in Zentralasien aus. Neueste genetische Studien liefern hingegen Hinweise, dass Gerste vermutlich ein zweites Mal kultiviert wurde und stützen die Theorie eines polyphyletischen Ursprungs. Als sekundäre Domestikationszentren werden der Osten des „Fruchtbaren Halbmondes“ (MORRELL & CLEGG, 2007), Zentralasien und die Tibetische Hochebene (DAI *et al.*, 2012) diskutiert. Aus der Wildform *Hordeum spontaneum* ging die Kulturform der Gerste *Hordeum vulgare* ssp. *vulgare* (L.) hervor, im Folgenden *Hordeum vulgare* genannt. Bis heute ist die Gattung *Hordeum* weltweit verbreitet (siehe Abbildung 2.1). Jedoch hält die Debatte der mono- oder polyphyletischen Abstammung aller heutigen modernen Kultivare und Landrassen von *Hordeum spontaneum* weiter an.



Abbildung 2.1 Herkunfts- (rot)- und Anbauggebiete (grün) der Gerste (Max-Planck-Institut für Pflanzenzüchtungsforschung, Köln, erschienen in „Kulturpflanzen“, Thomas Miedaner, Springer-Verlag, 2014).

2.3 Genpool der Gerste (*Hordeum*)

Die Gattung *Hordeum* gehört zur Familie der Süßgräser (*Poaceae*). Sie besteht aus 33 Arten (BLATTNER, 2009) und ca. 45 Taxa (BOTHMER *et al.*, 2003). Alle Arten zeigen ähnliche morphologische Merkmale, unterscheiden sich jedoch stark in Chromosomensatz und Lebensform (BOTHMER *et al.*, 2003). Eine Möglichkeit, alle Arten und Taxa hinsichtlich der Nutzung genetischer Ressourcen für die Züchtung zu gruppieren, liefert das Genpool-Konzept nach BOTHMAR *et al.*, (1992). Die Einteilung erfolgt in drei Genpools (siehe Abbildung 2.2). Der primäre Genpool umfasst die Wildform (*Hordeum spontaneum*) sowie die Kulturform (*Hordeum vulgare*) der Gerste, mit zahlreichen Kultivaren, Elite- und Zuchtformen, Varietäten und Landrassen. Innerhalb dieser Gruppe kann ein problemloser Gentransfer stattfinden. Landrassen (*landraces*) werden definiert als lokale Formen einer domestizierten Pflanzenart, welche an die natürlichen Bedingungen ihrer Region angepasst sind (SALAMINI *et al.*, 2002). Im Gegensatz zu modernen Varietäten (*breeding lines* und *cultivars*) sind sie nicht durch Züchtungsprozesse entstanden. Landrassen besitzen eine hohe genetische Variation und liefern aufgrund ihrer natürlichen Standhaftigkeit gegenüber widrigen Umweltbedingungen ein großes Potential für die Züchtung toleranter Gerste-Sorten (NEWTON *et al.*, 2010). Der sekundäre Genpool besteht aus einer Art, *Hordeum bulbosum*. Ein Gentransfer in Kulturgerste ist schwierig, aber möglich (PICKERING *et al.*, 2000). Alle übrigen Arten von *Hordeum* besitzen eine eingeschränkte Fähigkeit des Gentransfers und werden im tertiären und letzten Genpool klassifiziert (BOTHMER *et al.*, 2003).

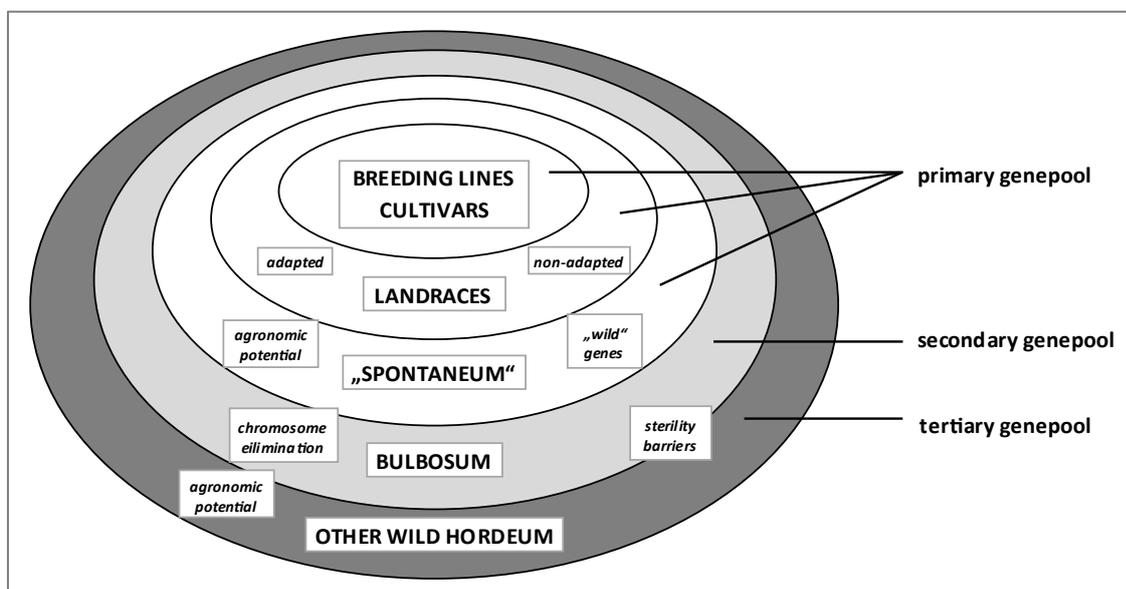


Abbildung 2.2 Genpools der Gattung *Hordeum* (verändert nach BOTHMER *et al.*, 2003).

2.4 Gerste als Modellorganismus für die Forschung

Gerste wird neben ihrer enormen wirtschaftlichen Bedeutung auch als wichtiges genetisches Forschungsmodell genutzt. Grund dafür ist der geringe Ploidiegrad. Die Kultur- und Wildform von *Hordeum* besitzen im Gegensatz zum hexaploiden Weizen ein diploides Genom ($2n=2x=14$) mit 7 Chromosomen. Gerste ist überwiegend selbstbefruchtend, mit einem relativ kurzen Generationszyklus von etwa 15 Wochen und leicht kreuzungsfähig innerhalb des primären Genpools (ZOHARY, HOPF & WEISS, 2012), (siehe Kapitel 2.3). Diese Eigenschaften machen die Gerste heute auch zu einem wichtigen Modellorganismus der Genomforschung. Die molekulargenetischen Erkenntnisse über grundlegende, bedeutende, agronomische Eigenschaften, Resistenz-Gene und Signalwege können für die Züchtung genutzt werden.

Das „*International Barley Genome Sequencing Consortium*“ (IBSC) veröffentlichte die bisher ausführlichste genetische Karte, mit über 26.000 identifizierten Genen (IBSC, 2012). Darüber hinaus existieren bereits eine Vielzahl an molekularen Daten und Datenbanken von Gerste (SREENIVASULU *et al.*, 2008).

Microarrays ermöglichen die Analyse und Charakterisierung der Genexpression in verschiedenen Genotypen, Geweben, Entwicklungsstadien sowie unter diversen Stressbedingungen. Vergleichende Expressionsstudien liefern Rückschlüsse auf die Ausprägung eines Phänotyps. So können neue bedeutende Gene und Gengruppen, wie z.B. Kandidaten-Gene in Stress-Signalwegen, identifiziert werden. Der „*Agilent Barley Gene Expression Microarray*“ besteht aus insgesamt 62976 Proben (KOHL *et al.*, 2015) und ist die derzeitig umfangreichste Microarray-Plattform.

2.5 Trockenstress – ein limitierender Faktor für die Landwirtschaft

Pflanzen sind aufgrund ihrer sessilen Lebensform ihrer Umwelt direkt ausgesetzt. Trockenstress, ein abiotischer Stressfaktor, verzögert pflanzliche Wachstums- und Entwicklungsprozesse, reduziert drastisch die weltweiten Ernteerträge und führt in Extremfällen zum Tod der Pflanze. Die Entschlüsselung des komplexen molekularen Netzwerkes der Trockenstress-Resistenz ist eine wichtige Basis für die Züchtung toleranter Kultivare. Für eine große Anzahl an Genen und Gengruppen, Transkripten und Proteinen konnte bisher die Beteiligung an der Stressantwort bestätigt werden, wobei ihre Funktion teilweise noch unklar ist (SHINOZAKI & YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2007; SINGH & LAXMI, 2015; KRANNICH *et al.*, 2015). Microarray-Analysen mit Gerste liefern erste Hinweise über die

spezifische Regulation dieser Gene unter Trockenstressbedingungen (OZTURK *et al.*, 2002; TALAME *et al.*, 2007; TOMMASINI *et al.*, 2008; GUO *et al.*, 2009, SEILER *et al.*, 2011).

2.6 Die trockenstress-induzierte Blattseneszenz

2.6.1 Trockenstress induziert Seneszenz-Prozesse

Einjährige Getreidepflanzen, wie Gerste, sind monokarpe Pflanzen. Das Absterben einzelner Blätter und letztlich der gesamten Pflanze ist eng verknüpft mit der Produktion reifer Samen, welche nach der Keimung den neuen Lebenszyklus einleiten (NOODÉN *et al.*, 1997). Die Blattseneszenz ist die letzte Entwicklungsphase eines Blattes. Sie ist charakterisiert durch Degradations- und Recyclingprozesse. Dabei wird das Blatt zu einem sogenannten „source“-Gewebe. Das bedeutet, dass die angesammelten Ressourcen (Nährstoffe) remobilisiert werden. Diese Nährstoffe werden zunächst in eine Transportform abgebaut und dann in „sink“-Gewebe wie Folgeblätter oder Samen transportiert (LIM *et al.*, 2007). Dieser Remobilisierungsprozess wird genetisch gesteuert. Durch eine komplexe Umprogrammierung der Genexpression wird die Seneszenz eingeleitet. Eine Vielzahl an induzierten Genen (SAG – *senescence-associated genes*) und reprimierten Genen (SDG – *senescence down-regulated genes*) wurde bereits durch umfassende Transkriptanalysen identifiziert und hinsichtlich ihres Expressionsmusters klassifiziert (BUCHANAN-WOLLASTON *et al.*, 2005; BREEZE *et al.*, 2011).

Ein besonderes SAG ist *HvS40*. Es codiert für einen putativen Regulator der Blattseneszenz in *Hordeum vulgare*, welcher im Zellkern lokalisiert ist (KRUPINSKA *et al.*, 2002). *HvS40* ist sowohl im Verlauf der natürlichen Blattseneszenz, als auch durch Dunkelheit und als Reaktion auf biotische und abiotische Stressfaktoren, wie z.B. Trockenstress, induziert. Dies lässt vermuten, dass *HvS40* als zentrales Verbindungsglied verschiedener Seneszenz- und Stress-Signalwege wirksam ist (KRUPINSKA *et al.*, 2014).

Der komplexe Prozess der Blattseneszenz kann durch interne Signale (z.B. Phytohormone) und externe Signale (abiotische und biotische Faktoren) gesteuert werden. Trockenstress bewirkt ein vorzeitiges Einsetzen pflanzlicher Seneszenz-Prozesse (BUCHANAN-WOLLASTON *et al.*, 2003; GUO & GAN, 2005, LIM *et al.*, 2007,). Dadurch kann die Pflanze einerseits wichtige Nährstoffe wiederverwerten und den Wasserhaushalt aufrechterhalten (MUNNÉ-BOSCH & ALEGRE, 2004). Andererseits bewirkt Trockenstress die verfrühte Induktion der Blüte und Samenreifung. Für Kulturpflanzen, wie Gerste, führt dies als negative Konsequenz zu einer geringen Produktivität und damit zu massiven Ernteverlusten (SAMARAH *et al.*, 2005; GREGERSEN *et al.*, 2013).

Andererseits konnte wiederum gezeigt werden, dass die Verzögerung der Blattseneszenz die Trockentoleranz verbessert. Dies belegen Forschungen an Mais (YOUNG *et al.*, 2004), Tabak (RIVERO *et al.*, 2007) und Weizen (TIAN *et al.*, 2015).

2.6.2 Pflanzen reagieren auf Trockenstress

Im Laufe ihrer Evolution haben Pflanzen Strategien entwickelt, um in Zeiten von Wasserknappheit ihr Überleben zu sichern. Die Stressflucht (*escape*) beschreibt den Abschluss des Lebenszyklus vor Stressbeginn. Dagegen machen morphologisch-anatomische und physiologische Merkmale die Stressresistenz aus und bewirken eine Stressvermeidung (*avoidance*) und Stresstoleranz (*tolerance*) (LEVITT, 1980, CHAVES *et al.*, 2003). Die pflanzliche Trockenstress-Antwort findet auf physiologischer, zellulärer und molekularer Ebene statt und ist abhängig von Pflanzenart und Genotyp, Entwicklungsstadium, Organ, Zelltyp sowie Dauer und Stärke des Stresses (SHINOZAKI & YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2007, BARNABAS *et al.*, 2008). Eine zentrale Rolle im Trockenstressgeschehen spielt das Phytohormon Abscisinsäure (ABA) (NAMBARA & MARION-POLL, 2005; ZHANG *et al.*, 2006; NAKASHIMA & YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2013). Dieses Stresshormon bewirkt das Schließen der Stomata in den Blättern um die Transpiration zu verringern. Des Weiteren kommt es zu einem verstärkten Wurzelwachstum bei gleichzeitigem verringertem Wachstum oberirdischer Pflanzenteile. Zur Aufrechterhaltung des Turgors werden verstärkt osmotisch wirksame Substanzen (*compatible solutes*) synthetisiert, z.B. Zucker (Sucrose, Trehalose, Sorbitol), Zuckeralkohole (Mannitol), Aminosäuren (Prolin) und Amine (Glycin, Betain, Polyamin). Diese Moleküle halten die zelluläre Aktivität und Struktur aufrecht (BARTELS & SUNKAR, 2005). Unter Trockenstressbedingungen kommt es vermehrt zur Akkumulation von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS – *reactive oxygen species*). Ihre zellschädigende Wirkung besteht in der Oxidation zellulärer Lipide und Proteine sowie DNA und RNA (CARVALHO, 2008). Pflanzen schützen sich vor der destruktiven Wirkung der ROS durch eine verstärkte Synthese von Radikalfängern. Dazu zählen verschiedene Enzyme, wie z.B. Superoxid Dismutase, Ascorbat-Peroxidase, Katalase, sowie antioxidative Substanzen (Ascorbat, Glutathion) (BARTELS & SUNKAR, 2005).

Auf molekularer Ebene werden viele verschiedene stressabhängige Gene reguliert. Diese Gene werden in zwei große Gruppen unterteilt. Eine Gruppe codiert für regulatorische Genprodukte, wie z.B. Transkriptionsfaktoren und Transkriptionsregulatoren, Proteinkinasen

und -phosphatasen sowie Signalmoleküle (SHINOZAKI & YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2007; UMEZAWA *et al.*, 2006 FUJITA *et al.*, 2011). Die zweite Gruppe umfasst alle Genprodukte, welche die Pflanzenzellen direkt vor Trockenstress schützen und die Stresstoleranz realisieren, im Folgenden als funktionelle Genprodukte bezeichnet. Neben den bereits genannten Molekülen zählen z.B. auch Chaperone, LEA (*late embryogenesis-abundant*) Proteine, HSPs (*heat-shock proteins*), Aquaporine, Proteasen und Enzyme der Osmolyt-Biosynthese dazu. LEA-Proteine sind extrem hydrophile Proteine. Sie wurden erstmals in Samen der mexikanischen Baumwolle (*Gossypium hirsutum*) während des späten Stadiums der Embryogenese entdeckt und benannt (GALAU *et al.*, 1986). Neben der Austrocknung von Samen spielen sie eine wichtige Rolle unter Stressbedingungen, z.B. Trockenstress, indem sie andere Proteine und Membranen stabilisieren (TUNNACLIFFE & WISE, 2007). HvA1 gehört zur Gruppe 3 der LEA-Proteine und wurde aus der Aleuronschicht von *Hordeum vulgare* isoliert und charakterisiert. Dieses Gen ist durch die Behandlung mit ABA und unter Stressbedingungen, wie beispielsweise Trockenstress, Hitze, Kälte sowie Salz, induziert (HONG *et al.*, 1992).

Die folgenden Kapitel fokussieren auf die Transkriptionsfaktoren (regulatorische Gengruppe), und Polyamine (funktionelle Gengruppe) sowie ihre Bedeutung in der pflanzlichen Trockenstress-Antwort.

2.6.3 Transkriptionsfaktoren (TF)

TF sind DNA-bindende Proteine. Sie regulieren die Expression spezifischer Ziel-Gene. Dabei interagieren TF mit anderen Transkriptionsregulatoren, wie Chromatin Remodeling- oder modifizierenden Proteinen, und ermöglichen bzw. verhindern dadurch den Zugang der RNA-Polymerase zur DNA (UDVARDI *et al.*, 2007). Bei der pflanzlichen Stressantwort spielen TF als zentrale Regulatoren eine wichtige Rolle.

Nach der Perzeption des Trockenstress-Signals bewirken Proteinkinasen und -phosphatasen (z.B. MAP-Kinasen, Serin-Threonin-Kinasen/Phosphatasen) und sekundäre Botenstoffe (*second messengers*), z.B. Calcium-Ionen (Ca^{2+}), IP_3 (Inositol-1,4,5-triphosphat), DAG (Diacylglycerin), ROS, cAMP (Cyclisches Adenosinmonophosphat) die Signaltransduktion und initiieren die Expression von funktionellen und regulatorischen Genen, z.B. TF (BHARGAVA & SAWANT, 2013). Im weiteren Verlauf der Signalkaskade wirken die TF auf nachgeschaltete (*downstream*) Signalwege. Auf diese Weise kann ein einziger TF eine Vielzahl von Genen und Gen-Clustern regulieren. Eine solche Gruppe unabhängiger, durch denselben TF regulierter

Gene, wird als Regulon bezeichnet (SINGH & LAXMI, 2015). Das Phytohormon ABA induziert die Expression spezifischer Gene (SEKI *et al.*, 2007). Neben ABA-abhängigen Signalwegen können Trockenstress-Gene auch durch ABA-unabhängige Signalwege reguliert werden (YAMAGUCHI-SHINOZAKI & SHINOZAKI, 2006). Folgende trockenstress-induzierte Regulons sind in *Arabidopsis thaliana* beschrieben (SINGH & LAXMI, 2015):

1. AREB/ABF Regulon

AREB/ABF (*ABA-responsive element binding protein/ABA-responsive element (ABRE)-binding factor*)-TF gehören zur bZIP (*basic leucine zipper*)-TF-Familie. Sie sind in der ABA-abhängigen Genexpression involviert (FUJITA *et al.*, 2011). In *Hordeum vulgare* sind 15 von 141 bZIP-TF im Trockenstressgeschehen involviert (POURABED *et al.*, 2014).

2. DREB1/CBF und DREB2 Regulons

DREB1/CBF (*Dehydration-responsive element binding protein 1 (DREB1)/C-repeat binding factor*) und DREB2-TF sind in der ABA-unabhängigen Genexpression beteiligt (LIU *et al.*, 1998, AKHTAR *et al.*, 2012). Sie gehören zur Genfamilie AP2/ERF (*APETALA2/ethylene-responsive element-binding factor*).

3. NAC Regulon

NAC (NAM, ATAF, CUC)-TF sind wichtige Regulatoren pflanzlicher Entwicklungsprozesse und der abiotischen und biotischen Stressantwort (OLSEN *et al.*, 2005; NAKASHIMA *et al.*, 2012; NURUZZAMAN *et al.*, 2013). NAC-TF sind in der Trockenstress-Antwort über ABA-unabhängige Signalwege involviert. In *Hordeum vulgare* codieren 48 Gene für NAC-TF (CHRISTIANSEN *et al.*, 2011).

Eine Vielzahl von weiteren TF wurde in der molekularen Trockenstress-Antwort identifiziert. Dazu zählen Mitglieder der Genfamilien MYB (gehört zur bHLH (*basic helix loop helix*) Genfamilie) (BALDONI *et al.*, 2015), MYC (CASTILHOS *et al.*, 2014), WRKY (BANERJEE & ROYCHOUHDURY, 2015) und NF-Y (*nuclear factor-Y*, gehört zur CCAAT-box binding- TF Genfamilie) (LALOUM *et al.*, 2013). ZF-HD (*zinc-finger homeodomain*)-TF aktivieren vermutlich einzeln die Expression von Stress-Genen, aber auch in Kooperation mit NAC-TF (TRAN *et al.*, 2007).

Auf der Ebene der TF findet möglicherweise eine Überschneidung und Vernetzung (*crosstalk*) verschiedener Signalwege in der abiotischen Stressantwort, wie Trockenheit, Hitze und Kälte,

statt. (NAKASHIMA *et al.*, 2014). In Abbildung 2.3 sind einige wichtigen TF des regulatorischen Netzwerkes der Trockenstress-Antwort dokumentiert. Analysen deuten darauf hin, dass die Gengruppe der TF eine wichtige Rolle im Prozess der Domestikation von Kulturpflanzen spielten (DOEBLEY *et al.*, 2006). Zudem ist für einige Mitglieder der TF-Genfamilien CCAAT, homeodomain, bHLH, NAC, AP2/ERF, bZIP und WRKY eine potentielle Funktion in der Verbesserung der Trockenstress-Toleranz in Kulturpflanzen publiziert (RABARA *et al.*, 2014). Die Überexpression ausgewählter TF ergab trockentolerante Phänotypen in z.B. Reis, Weizen, Soja, Tabak und Tomate (RABARA *et al.*, 2014). Aus diesem Grund sind die Mitglieder dieser Genfamilien für die Züchtung und die damit verbundene Verbesserung der Trockentoleranz in Gerste und anderen Getreidepflanzen besonders interessante Kandidaten.

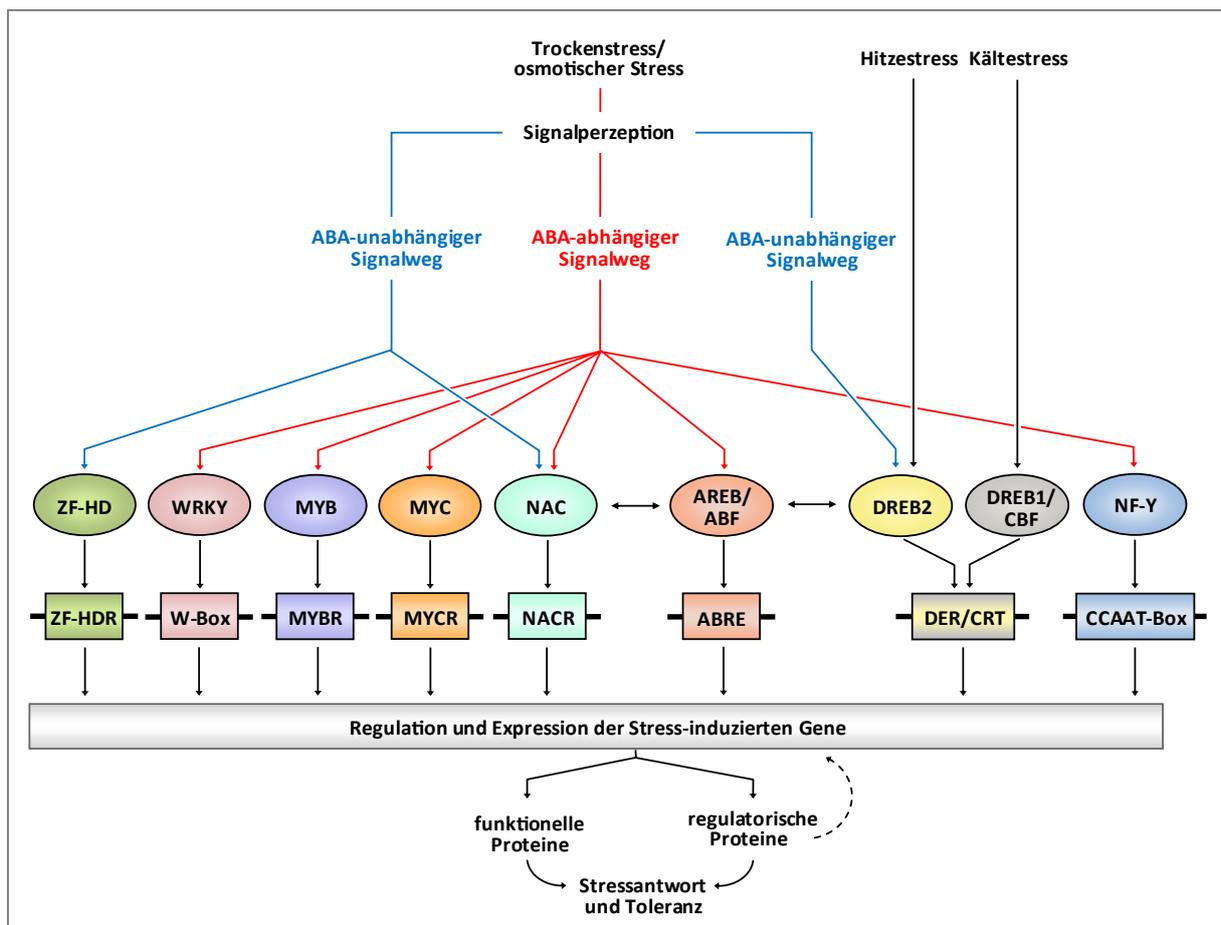


Abbildung 2.3 Regulatorisches Netzwerk der wichtigsten TF der Trockenstress-Antwort. Die Perzeption des Trockenstress-Signals aktiviert ABA-abhängige (rot) und ABA-unabhängige (blau) Signalwege. In ABA-abhängigen Signalwegen führt die Akkumulation von ABA zur Aktivierung verschiedener TF der Genfamilien WRKY, MYB, MYC, NAC, AREB/ABF und NF-Y. Einige NAC-TF können auch in ABA-unabhängigen Signalwegen reguliert werden. Ebenfalls ABA-unabhängig werden TF der Genfamilien ZF-HD und DREB2 aktiviert. Hitzestress wirkt ebenfalls auf die Aktivität von DREB2 und Kältestress auf DREB1/CBF. Ein *crossstalk* ABA-abhängiger und ABA-unabhängiger Signalwege in der Trockenstress-Antwort wird vermutet. TF sind als Ellipsen dargestellt Die Promotorregionen in den Ziel-Genen (*cis-element*) sind als Rechtecke dargestellt. (verändert nach NAKASHIMA *et al.*, 2014; SINGH & LAXMI, 2015).

2.6.4 Polyamine

PA sind kationische, aliphatische, organische Moleküle, mit zwei oder mehreren Aminogruppen und kommen in allen lebenden Organismen vor (MORGAN, 1999). Sie interagieren aufgrund ihrer positiven Ladung mit DNA, RNA, Proteinen und Phospholipiden und regulieren somit die Eigenschaften von Membranen, die Struktur und Funktion von Nucleinsäuren sowie Enzymaktivitäten (GALSTON & SAWHNEY, 1990).

Polyamine sind in Prozessen verschiedener pflanzlicher Entwicklungsphasen involviert, z.B. Organogenese, Embryogenese, Blüten- und Fruchtentwicklung sowie Seneszenz (KUSANO *et al.*, 2008; ALCÁZAR *et al.*, 2010; HUSSAIN *et al.*, 2011). Sie wirken als Radikalfänger, schützen Membranen vor oxidativem Stress und regulieren vermutlich auch die Genexpression, indem sie die DNA-Bindeaktivität von TF fördern (BOUCHEREAU *et al.*, 1999; PANAGIOTIDIS *et al.*, 1995). Weiterhin wird ihre wichtige Bedeutung in der biotischen und abiotischen Stressantwort diskutiert (BOUCHEREAU *et al.*, 1999; GILL & TUTEJA, 2010; LIU *et al.*, 2007; YANG *et al.*, 2007; ALCÁZAR *et al.*, 2011; HUSSAIN *et al.*, 2011; RANGAN *et al.*, 2014). Analysen zeigen, dass ein veränderter und hoher Polyamin-Gehalt die Trockentoleranz positiv beeinflusst (CAPELL *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2007; GROPPA & BENAVIDES, 2008; GUPTA *et al.*, 2013). Dabei könnte die Veränderung des Polyamin-Gehalts sowohl als Signal-Überträger, aber auch als Stress-Signal selbst fungieren. Die am häufigsten vorkommenden Polyamine sind Putrescin (Diamin), Spermidin (Triamin) und Spermin (Tetramin). Sie kommen in freier, konjugierter, aber auch fest verbundener Form in höheren Pflanzen vor (EVANS & MALMBERG, 1989).

Der Metabolismus der Polyamine ist in Abbildung 2.4 dargestellt. Im ersten Schritt der Polyamin-Biosynthese wird Putrescin gebildet. Putrescin entsteht durch eine Decarboxylierung von entweder Ornithin oder Arginin, katalysiert durch die Ornithin-Decarboxylase (ODC) oder die Arginin-Decarboxylase (ADC). Über beide Synthesewege wird das Diamin Putrescin gebildet. In zwei weiteren Reaktionsschritten entsteht durch die Aufnahme von Aminopropylgruppen zunächst Spermidin, durch die Spermidin-Synthase (SPDS) und dann Spermin, durch die Spermin-Synthase (SPMS). Die Aminopropylgruppen stammen aus S-Adenosylmethionin (SAM) durch die SAM-Decarboxylase. SAM wiederum ist der Vorläufer des Phytohormons Ethylen, welches über 1-Aminocyclopropancarbonsäure (ACC) durch die ACC-Synthase und die ACC-Oxidase freigesetzt wird. Der Abbau der Polyamine erfolgt durch die Polyamin-Oxidasen (PAO) und die Diamin-Oxidasen (DAO) unter Freisetzung von H₂O₂. PAO oxidieren sekundäre Aminogruppen von Spermin und Spermidin und

katalysieren somit die Rückkonvertierung zu Putrescin. DAO setzen den Abbau der Diamine fort (ALCAZAR *et al.*, 2006).

Der Polyamin-Metabolismus ist stark mit anderen Stoffwechselwegen und Signalwegen vernetzt. Polyamine beeinflussen die Bildung und Aktivität verschiedener Signalmoleküle und Metabolite (H_2O_2 , NO, Ethylen, Prolin), welche in der abiotischen und biotischen Stressantwort involviert sind (ALCÁZAR *et al.*, 2010). Eine wichtige Funktion übernehmen Polyamine in der Trockenstress-Antwort. Die Überexpression von Genen der Polyamin-Biosynthese in transgenen Pflanzen erzielte eine verbesserte Trockentoleranz in *Arabidopsis thaliana*, Süßkartoffel, Reis, Tabak und Tomate (KASUKABE *et al.*, 2004 und 2006; CAPELL *et al.*, 2004; WANG *et al.*, 2011).

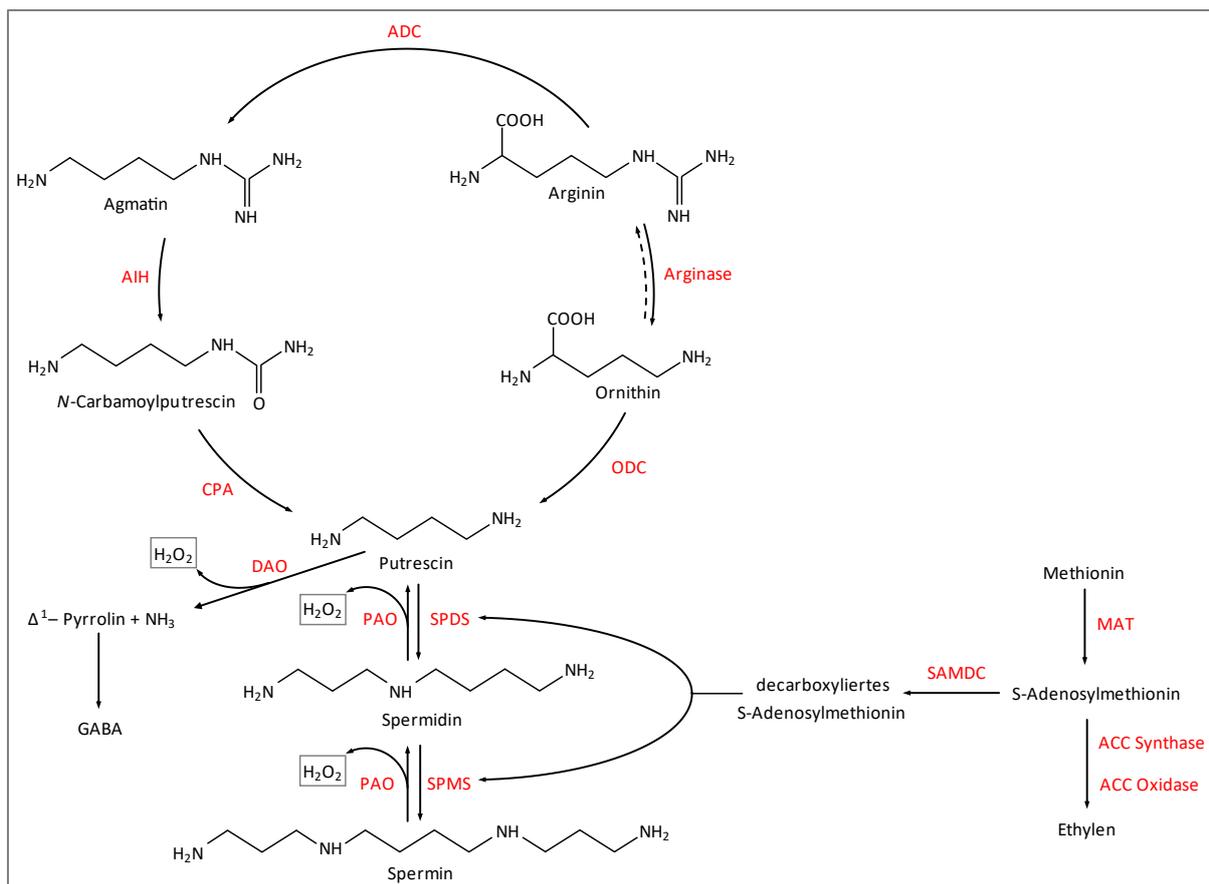


Abbildung 2.4 Polyamin-Metabolismus. ACC – 1-Aminocyclopropan-carbonsäure, ADC – Arginin-Decarboxylase, AIH – Agmatin-Iminohydrolase, CPA – N-Carbamoylputrescin-Aminohydrolase, DAO – Diamin-Oxidase, GABA – γ -Aminobuttersäure, MAT – Methionin-Adenosyltransferase, ODC – Ornithin-Decarboxylase, PAO – Polyamin-Oxidase, SAMDC – S-Adenosylmethionin-Decarboxylase, SPDS – Spermidin-Synthase, SPMS – Spermin-Synthase, (verändert nach ALCÁZAR *et al.*, 2010; GUPTA *et al.*, 2013; RANGAN *et al.*, 2014; http://homepage.ruhr-uni-bochum.de/Markus.Piotrowski/Research_Polyamine.html)

III Zielsetzung

Die Widerstandsfähigkeit einer Pflanze gegenüber Trockenstress ist ein sehr komplexes Merkmal. Dabei sind die Prozesse der Trockenstress-Antwort und der Blattseneszenz eng miteinander vernetzt und entscheidend für das Überleben der Pflanze (MUNNÉ-BOSCH & ALEGRE, 2004).

Vor allem bei Gerste und anderen Getreidepflanzen kann die trockenstress-induzierte Blattseneszenz massive Ernteverluste bewirken. Aus diesem Grund ist die Aufklärung der genetischen Mechanismen für die Ausbildung der Trockentoleranz in den letzten Jahren immer weiter in den Fokus der Forschung gerückt. Dabei liefert die hohe genetische Diversität zahlreicher Kultivare von *Hordeum vulgare*, darunter Wildformen, Elitesorten und Landrassen, eine gute Basis für die Entwicklung toleranter Sorten.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit werden verschiedene Kultivare von *Hordeum vulgare* hinsichtlich ihrer Trockentoleranz getestet. Das trocken-toleranteste und das trocken-sensitivste Kultivar sollen daraufhin für die vergleichenden Analysen der trockenstress-induzierten Blattseneszenz genutzt werden. Dabei wird die unterschiedliche Trockenstress-Antwort beider Kultivare durch physiologische Messungen der PSII-Effizienz und des relativen Chlorophyllgehaltes untersucht. Weiterhin wird auf molekularer Ebene die Expression von Marker-Genen für Trockenstress und Seneszenz im Verlauf des Trockenstressexperiments analysiert.

Auf der Grundlage dieser Ergebnisse werden dann mit Hilfe eines Microarrays (Agilent 60K-barley) genomweite Expressionsanalysen durchgeführt. Damit sollen Gene und Gengruppen ermittelt werden, welche im Verlauf des Trockenstress-Experiments in beiden Kultivaren sowohl gemeinsam als auch unterschiedlich reguliert sind. Ein besonderer Fokus liegt dabei auf der großen Gruppe der Transkriptionsregulatoren. Mit Hilfe von Cluster-Analysen erfolgt ihre Einteilung hinsichtlich ihrer Expressionsmuster im Trockenstress-Verlauf. Auf diese Weise sollen als Ziel der vorliegenden Arbeit Kandidaten-Gene identifiziert werden, welche als zentrale Regulatoren wichtige Hinweise für die Ausbildung der Trockentoleranz liefern könnten.

IV Ergebnisse

4.1 Einfluss von Trockenstress auf Jungpflanzen verschiedener *Hordeum vulgare*- Kultivare

Der Vergleich zweier unterschiedlich toleranter Kultivare unter gleichen Stressbedingungen ist eine gute Methode um physiologische und molekulare Mechanismen der Stressantwort zu analysieren. Für die Untersuchung der trockenstress-induzierten Blattseneszenz war es zunächst notwendig, verschiedene Kultivare von *Hordeum vulgare* auf ihre Toleranz und Sensitivität unter dem Einfluss von Trockenstress zu testen. Dazu wurde das in der AG HUMBECK etablierte Testsystem, welches die Untersuchung der trockenstress-induzierten Seneszenz am Primärblatt der Jungpflanzen von *Hordeum vulgare* ermöglicht, benutzt (siehe Kapitel 6.2.2.1). Die zehn Kultivare wurden aufgrund ihrer unterschiedlichen Herkunft und diversen genetischen Ausstattung ausgewählt (Tabelle 4.1, siehe Kapitel 6.1.1). Darunter befinden sich Wildgersten (*H. spontaneum* und *H. agriocrithon*), syrische Landrassen (Er/Apm, Tadmor, Morocco9-75) und die Zuchtsorten (Lomerit, Marthe, Kendo, Merlot). Diese wurden mit dem Kultivar Scarlett, als Referenz, unter Trockenstressbedingungen verglichen.

Tabelle 4.1 *Hordeum* Kultivare zur Analyse der trockenstress-induzierten Blattseneszenz.

Kultivar	Subspezies	Quelle	Seneszenz Erscheinung
Scarlett	<i>vulgare</i>	BREUN (Quedlinburg)	Referenz
Er/Apm	<i>vulgare</i>	MPI Köln (AG VON KORFF)	+
Tadmor	<i>vulgare</i>	MPI Köln (AG VON KORFF)	+++
<i>H. spontaneum</i>	<i>spontaneum</i>	IPK Gatersleben	+
<i>H. agriocrithon</i>	<i>agriocrithon</i>	IPK Gatersleben	±
Lomerit	<i>vulgare</i>	Uni Kiel (AG KRUPINSKA)	±
Morocco9-75	<i>vulgare</i>	ICARDA Syrien	±
WI 2291	<i>vulgare</i>	ICARDA Syrien	±
Marthe	<i>vulgare</i>	IAEW Halle/Saale (AG PILLEN)	±
Kendo	<i>vulgare</i>	JKI Groß Lüsewitz (AG ORDON)	++
Merlot	<i>vulgare</i>	JKI Groß Lüsewitz (AG ORDON)	+++
IL	<i>vulgare</i>	IAEW Halle/Saale (AG PILLEN)	±

Der Einfluss der trockenstress-induzierten Blattseneszenz wurde durch visuelle Analyse (Turgor, Blattfärbung) nach 27 Tagen der Trockenstress-Behandlung evaluiert. Die Sorte Scarlett dient als Referenz. + leicht verzögert, ++ moderat verzögert, +++ stark verzögert, ± kein Unterschied. MPI - Max-Planck-Institut, ICARDA - *International Center for Agricultural Research in the Dry Areas*, IPK - Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung, JKI - Julius Kühn-Institut, IAEW - Institut für Agrar- und Ernährungswissenschaften.

Die Experimente ergaben einen stark verzögerten Seneszenz-Phänotyp für die Kultivare Tadmor und Merlot. Eine gute Anpassung an semiaride Gebiete konnte für Tadmor bereits bestätigt werden (GRANDO 1989; TEULAT *et al.*, 1997). Aus diesem Grund wurden Scarlett, als trockensensitives Kultivar und Tadmor, als trockentolerantes Kultivar ausgewählt, um die trockenstress-induzierte Blattseneszenz in den folgenden Experimenten im Detail zu erforschen.

4.2 Tadmor vs. Scarlett – vergleichende Analyse unter Trockenstress-Bedingungen

Die trockenstress-induzierte Blattseneszenz wurde im weiteren Verlauf unter Nutzung der zwei unterschiedlich toleranten Kultivare Scarlett und Tadmor ausführlich untersucht. Es erfolgten vergleichende Analysen auf physiologischer und molekularer Ebene, deren Ergebnisse in den folgenden Kapiteln dokumentiert sind. Die Untersuchungen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten im Verlauf der Trockenstress-Experimente durchgeführt, die als spezifische Stadien (T1-T8) bezeichnet wurden (siehe Kapitel 6.2.2.2). Neben der trockenstress-induzierten Seneszenz wurde zudem auch der Verlauf der natürlichen Seneszenz von Scarlett und Tadmor untersucht.

4.2.1 Physiologische Charakterisierung der trockenstress-induzierten Blattseneszenz

4.2.1.1 Dokumentation des verzögerten trockenstress-induzierten Seneszenz-Phänotyps von Tadmor

In Vorversuchen konnte bereits beobachtet werden, dass die Seneszenz-Prozesse im Kultivar Tadmor im Vergleich zu Scarlett unter Trockenstressbedingungen deutlich verzögert initiiert werden. Makroskopische Stresserscheinungen, wie absinkender Turgor und welkende Blätter waren bei Scarlett bereits zum Zeitpunkt T3 sichtbar. Im Gegensatz dazu setzte die Primärblatt-Seneszenz bei Tadmor deutlich verzögert zum Zeitpunkt T5 ein (Abbildung 4.1). Dieser Effekt konnte in vier unabhängigen biologischen Replikaten eindeutig bestätigt werden. Weiterhin waren zwischen den Kontroll-Pflanzen beider Kultivare keine Unterschiede im Verlauf der natürlichen Blattseneszenz zu beobachten. Die Blattalterungs-Prozesse traten etwa zum gleichen Zeitpunkt auf (T6). Dies wiederum deutet darauf hin, dass Tadmor spezifische Anpassungsmechanismen besitzt, die unter Trockenstressbedingungen im Gegensatz zu Scarlett eine frühzeitige Ausbildung der Seneszenz verhindern.

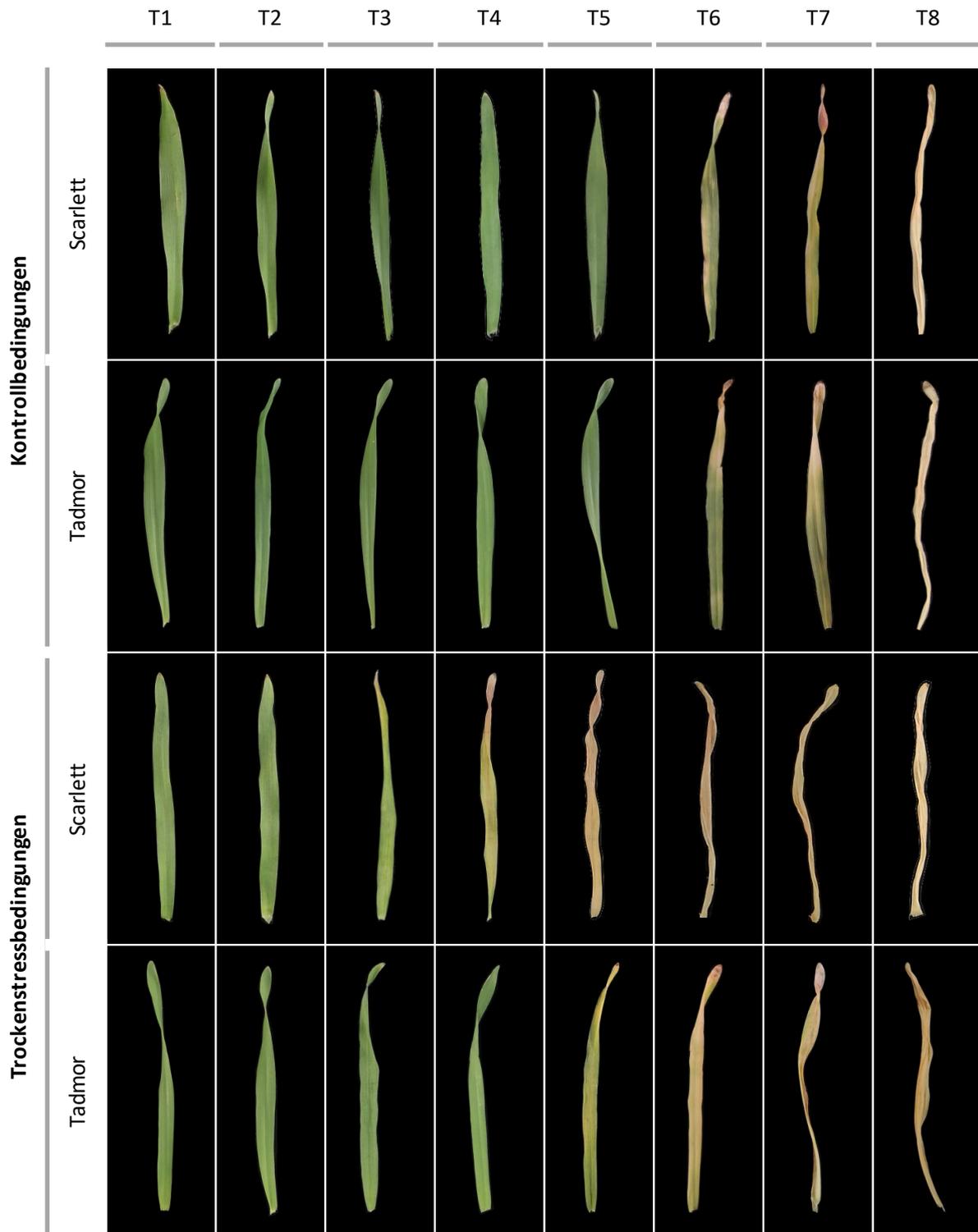


Abbildung 4.1 Bildliche Dokumentation phänotypischer Unterschiede zwischen Tadmor und Scarlett im zeitlichen Verlauf des Trockenstress-Experiments. Dargestellt sind die Primärblätter der Pflanzen unter Kontrollbedingungen (oben) und Trockenstressbedingungen (unten) zu den Zeitpunkten T1-T8.

4.2.1.2 Analyse der PSII-Effizienz und des relativen Chlorophyllgehaltes

Die Beobachtungen konnten durch die Bestimmung der Chlorophyll-Fluoreszenz (PSII-Effizienz) und des relativen Chlorophyll-Gehaltes bestätigt werden. Beides sind ideale Stress- und Seneszenz-Parameter (PTUSHENKO *et al.*, 2014). Die verminderte Fitness der Pflanzen, ausgelöst durch Trockenstressbedingungen, kann auf diese Weise direkt gemessen werden. Abbildung 4.2 zeigt die Veränderung der PSII-Effizienz (A) und des relativen Chlorophyllgehaltes (B) für Scarlett und Tadmor im zeitlichen Verlauf des Trockenstress-Experiments.

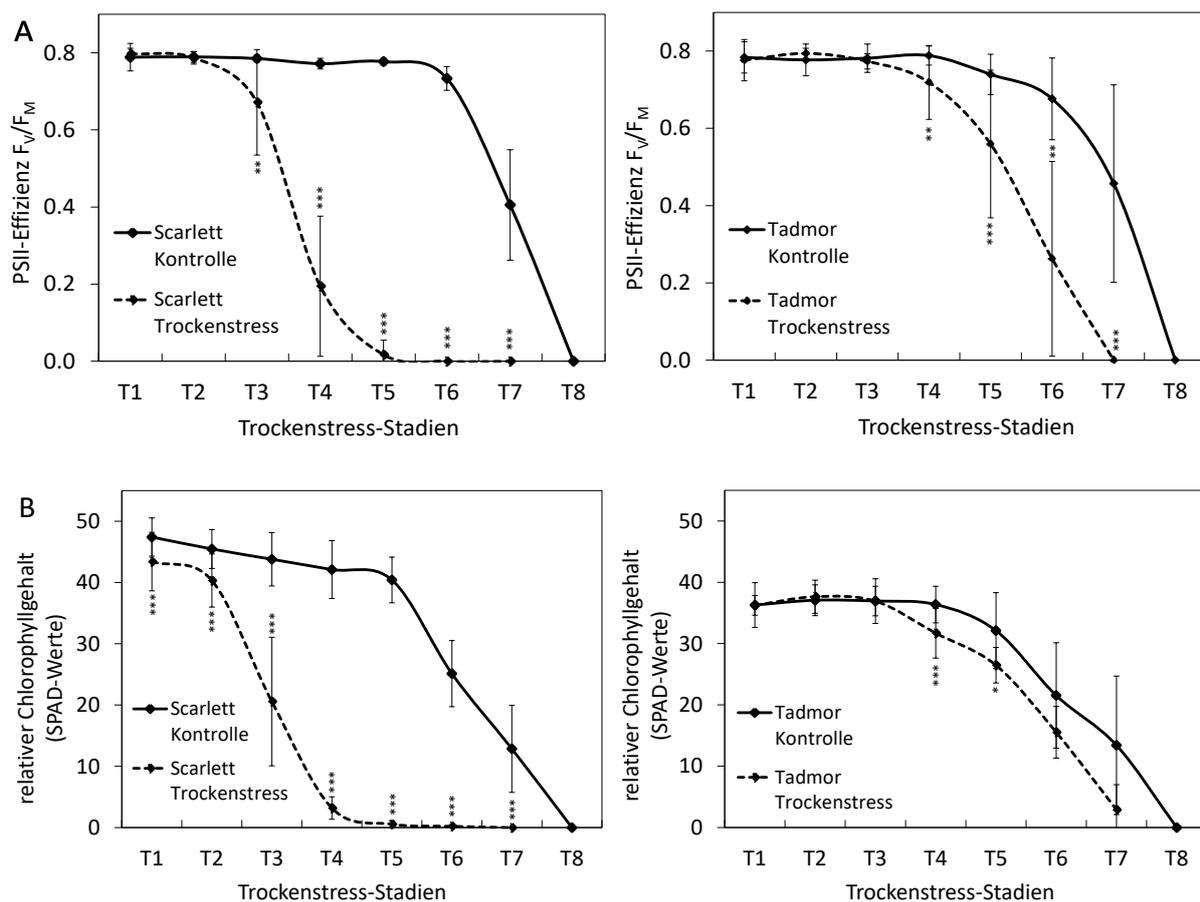


Abbildung 4.2 (A) PSII-Effizienz (F_v/F_m) und (B) relativer Chlorophyllgehalt (SPAD-Werte) in Abhängigkeit des zeitlichen Verlaufs des Trockenstress-Experiments (T1-T8) für Scarlett und Tadmor. Durchgehende Linie = Kontroll-Pflanzen (Scarlett und Tadmor); unterbrochene Linie = Pflanzen unter Trockenstress (Scarlett und Tadmor). Die Daten basieren auf min. drei unabhängigen biologischen Replikaten, mit jeweils min. vier Einzelmessungen für die PSII-Effizienz und min. 12 Einzelmessungen für den relativen Chlorophyllgehalt. * kennzeichnet signifikante Unterschiede zwischen Trockenstress und Kontrolle; zweiseitiger Student t-Test $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**), $p \leq 0,001$ (***)

Eine signifikante Abnahme der beiden Parameter unter Trockenstressbedingungen konnte für Scarlett bereits zum Zeitpunkt T4 ermittelt werden. Zu diesem Zeitpunkt liegt der relative Chlorophyllgehalt nur noch bei einem Wert von etwa 5. Die PSII-Effizienz zeigt bei T4 einen Wert von etwa 0,2. Zum Zeitpunkt T5 sind die Werte der PSII-Effizienz und des relativen Chlorophyllgehaltes kaum mehr messbar und die fortgeschrittene Seneszenz der Primärblätter ist deutlich sichtbar (Abbildung 4.1). Im Gegensatz dazu nehmen die beiden Stress-Parameter in Tadmor mit zunehmender Trockenheit nur allmählich ab und sind zum Zeitpunkt T5 noch relativ stabil (PSII-Effizienz: 0,56; relativer Chlorophyllgehalt: 26,5). Die spätere Abnahme der Parameter zu den Zeitpunkten T6 und T7 bestätigen den beobachteten verzögerten trockenstress-induzierten Seneszenz-Phänotyp von Tadmor (Abbildung 4.2 A und B). Zu diesen Zeitpunkten sind sowohl der relative Chlorophyllgehalt, als auch die PSII-Effizienz bei Scarlett unter Trockenstress nicht mehr messbar. Der Verlauf der natürlichen Blattseneszenz in den Kontroll-Pflanzen beider Kultivare ist ähnlich (Abbildung 4.1). Dies bestätigen die physiologischen Messungen der Kontroll-Pflanzen. Weiterhin fällt deutlich auf, dass beim Kultivar Tadmor der trockenstress-induzierte Seneszenz-Verlauf dem natürlichen Seneszenz-Verlauf der Kontroll-Pflanzen sehr ähnelt und bestätigt wiederum die bereits publizierte extreme Trockentoleranz (GRANDO 1989; TEULAT *et al.*, 1997; TEULAT *et al.*, 2001). Als weiteres Ergebnis konnte festgestellt werden, dass die Primärblätter von Tadmor unter Normalbedingungen blassgrün sind und der relative Chlorophyllgehalt im Vergleich zu Scarlett signifikant geringer ist (Abbildung 4.3). Der verringerte Gehalt an Chlorophyll und Carotinoiden in Tadmor wurde bereits untersucht und als wichtige Faktoren für die Anpassung an extreme klimatische Bedingungen, wie sie in der syrischen Steppe vorherrschen, vermutet (TARDY *et al.*, 1998).

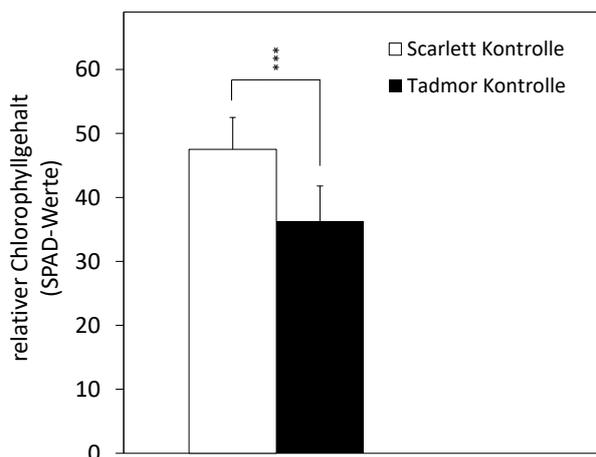


Abbildung 4.3 Relativer Chlorophyllgehalt (SPAD-Werte) ausgewachsener Primärblätter von Scarlett und Tadmor unter Kontrollbedingungen. Schwarzer Balken = Scarlett, grauer Balken = Tadmor. Die Daten basieren auf min. vier unabhängigen biologischen Replikaten, mit jeweils min. 12 Einzelmessungen. * kennzeichnet signifikante Unterschiede zwischen Scarlett und Tadmor; zweiseitiger Student t-Test $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**), $p \leq 0,001$ (***)).

4.2.2 Vergleichende Genexpressionsanalysen in Scarlett und Tadmor

4.2.2.1 Analyse der Expression der Marker-Gene *HvS40*, *HvA1*, *HvDhn1* und *HvHsp17*

Der physiologische Vergleich der beiden Kultivare bestätigt für Tadmor eine extreme Trockentoleranz mit einem stark verzögerten Seneszenz-Phänotyp im Vergleich zu Scarlett. Dieser Unterschied wird nun auf molekulare Ebene analysiert. Die Genexpression von vier spezifischen Marker-Genen (*HvS40*, *HvA1*, *HvDhn1*, *HvHsp17*) für Trockenstress und Seneszenz wurde in Scarlett und Tadmor untersucht und ist in Abbildung 4.4 dargestellt.

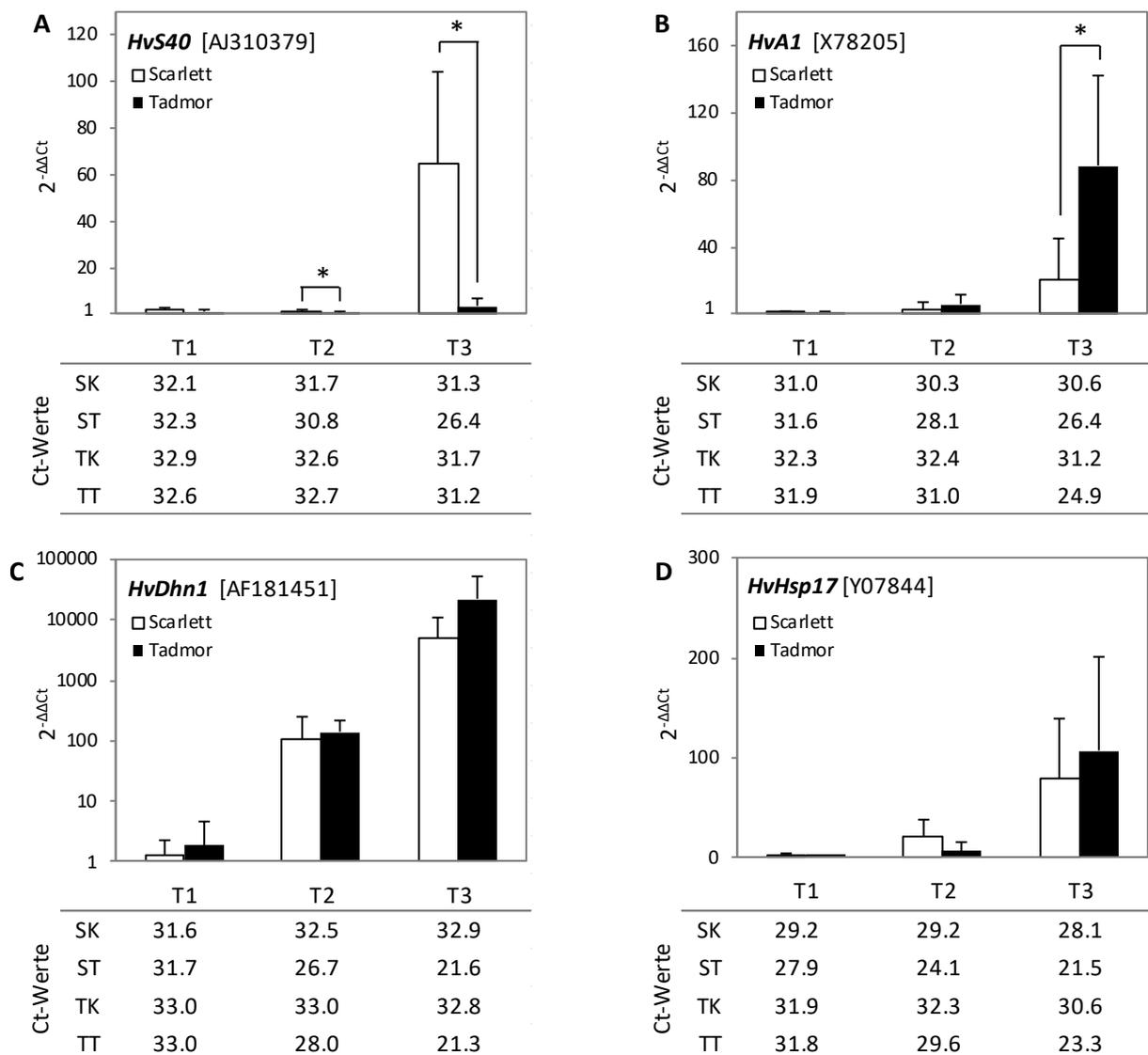


Abbildung 4.4 Relatives Expressionslevel ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) der Marker-Gene *HvS40* [AJ310379], *HvA1* [X78205], *HvDhn1* [AF043087] und *HvHsp17* [Y07844] unter Trockenstress in Scarlett und Tadmor. Die relativen Expressionslevel wurden mittels qRT-PCR für die drei Trockenstress-Stadien (T1, T2, T3) ermittelt und beziehen sich auf die jeweilige unbehandelte Kontrolle (K1, K2, K3), welche im Wert gleich 1 gesetzt wurde. Die gemittelten Ct-Werte sind unter dem Diagramm dargestellt. Die Normalisierung aller Werte erfolgte auf das Referenzgen *HvActin*. Die Mittelwerte mit den zugehörigen Standardabweichungen beruhen auf den Daten von drei biologischen Replikaten. SK-Scarlett Kontrolle, ST-Scarlett Trockenstress, TK-Tadmor Kontrolle, TT-Tadmor Trockenstress. * kennzeichnet signifikante Unterschiede zwischen Scarlett und Tadmor; zweiseitiger Student t-Test $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**), $p \leq 0,001$ (***)

Da Veränderungen auf genregulatorischer Ebene den physiologischen Anpassungen vorausgehen und erste physiologische Unterschiede zwischen Scarlett und Tadmor zum Zeitpunkt T3 auftraten, wurden die Zeitpunkte T1, T2 und T3 des Trockenstress-Experiments für die Genexpressionsanalysen und alle weiteren molekularen Analysen ausgewählt.

HvS40 wurde von KRUPINSKA *et al.*, 2002 als Marker-Gen für die Blattseneszenz identifiziert. Diese Autoren beschreiben seine zentrale Funktion in der Regulation der Blattseneszenz. Unter Trockenstressbedingungen ist *HvS40* in Scarlett zum Zeitpunkt T3 signifikant induziert (Abbildung 4.4 A). Zum selben Zeitpunkt ist der relative Chlorophyllgehalt in Scarlett bereits um die Hälfte gesunken (Abbildung 4.2 B). In Tadmor hingegen ist *HvS40* bis zum Zeitpunkt T3 nicht reguliert und die physiologischen Analysen dokumentieren bis zu diesem Zeitpunkt auch keinen signifikanten Unterschied zwischen Trockenstress- und Kontroll-Pflanzen (Abbildung 4.2 A, B). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die molekularen Prozesse der trockenstress-induzierten Blattseneszenz in Tadmor deutlich verzögert einsetzen.

HvA1 codiert für ein LEA-Protein und ist als Marker-Gen für Trockenstress beschrieben (Xu *et al.*, 1996, HONG *et al.*, 1992). Zum Zeitpunkt T3 ist *HvA1* signifikant stärker in Tadmor induziert als in Scarlett (Abbildung 4.4 B). Dies könnte einen Hinweis auf die verbesserte Trockentoleranz von Tadmor gegenüber Scarlett liefern.

HvDhn1 codiert ebenfalls für ein LEA-Protein der Gruppe 2 (CHOI *et al.*, 1999). Die Akkumulation von Dehydrinen erfolgt nicht nur während spezifischen Entwicklungsprozessen der Pollen- und Samenreifung, sondern ist auch durch abiotische Stressfaktoren, wie Trockenstress induziert (KOSOVÁ *et al.*, 2014; TOMMASINI *et al.*, 2008). Das Expressionsmuster von *HvDhn1* ist in Scarlett und Tadmor ähnlich. Dabei erfolgt die starke Induktion bereits zum Zeitpunkt T2 des Trockenstress-Experiments (siehe Abbildung 4.4 C).

HvHsp17 codiert ein kleines Hitzeschock-Protein (Klasse 2) und besitzt als Chaperon eine wichtige Funktion bei Faltung, Aufbau, Translokation und Degradation von Proteinen und schützt Zellen vor Schädigungen durch Stressbedingungen (WANG *et al.*, 2004). Im Verlauf des Trockenstress-Experiments ist *HvHsp17* in Scarlett und Tadmor induziert und zeigt in beiden Kultivaren ein ähnliches Expressionsmuster (siehe Abbildung 4.4 D).

4.2.2.2 Vergleichende Microarray-Analysen in Scarlett und Tadmor

Mit Hilfe eines benutzerdefinierten Microarrays (Agilent 60K-barley) werden nun genomweite Unterschiede und Veränderungen im Transkriptionsmuster beider Kultivare unter Trockenstressbedingungen untersucht. Die vergleichenden Genexpressionsanalysen erfolgen sowohl im zeitlichen Verlauf des Trockenstress-Experiments (T1 bis T3) als auch unter Kontrollbedingungen (K1) in beiden Kultivaren (siehe Kapitel 6.2.4.9).

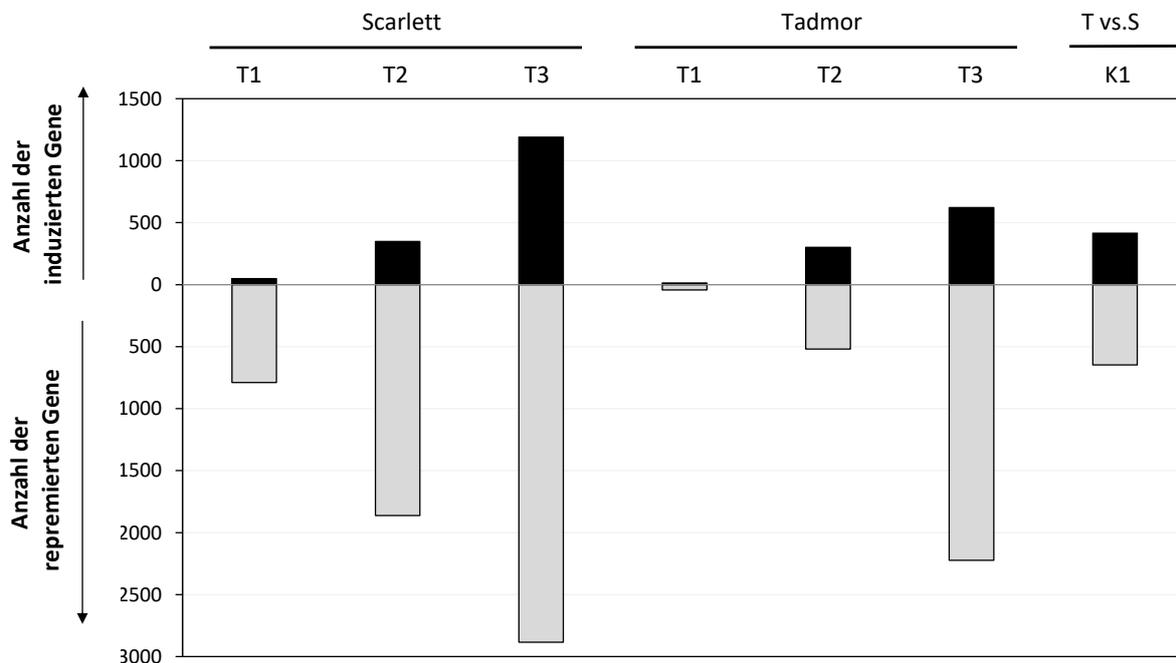
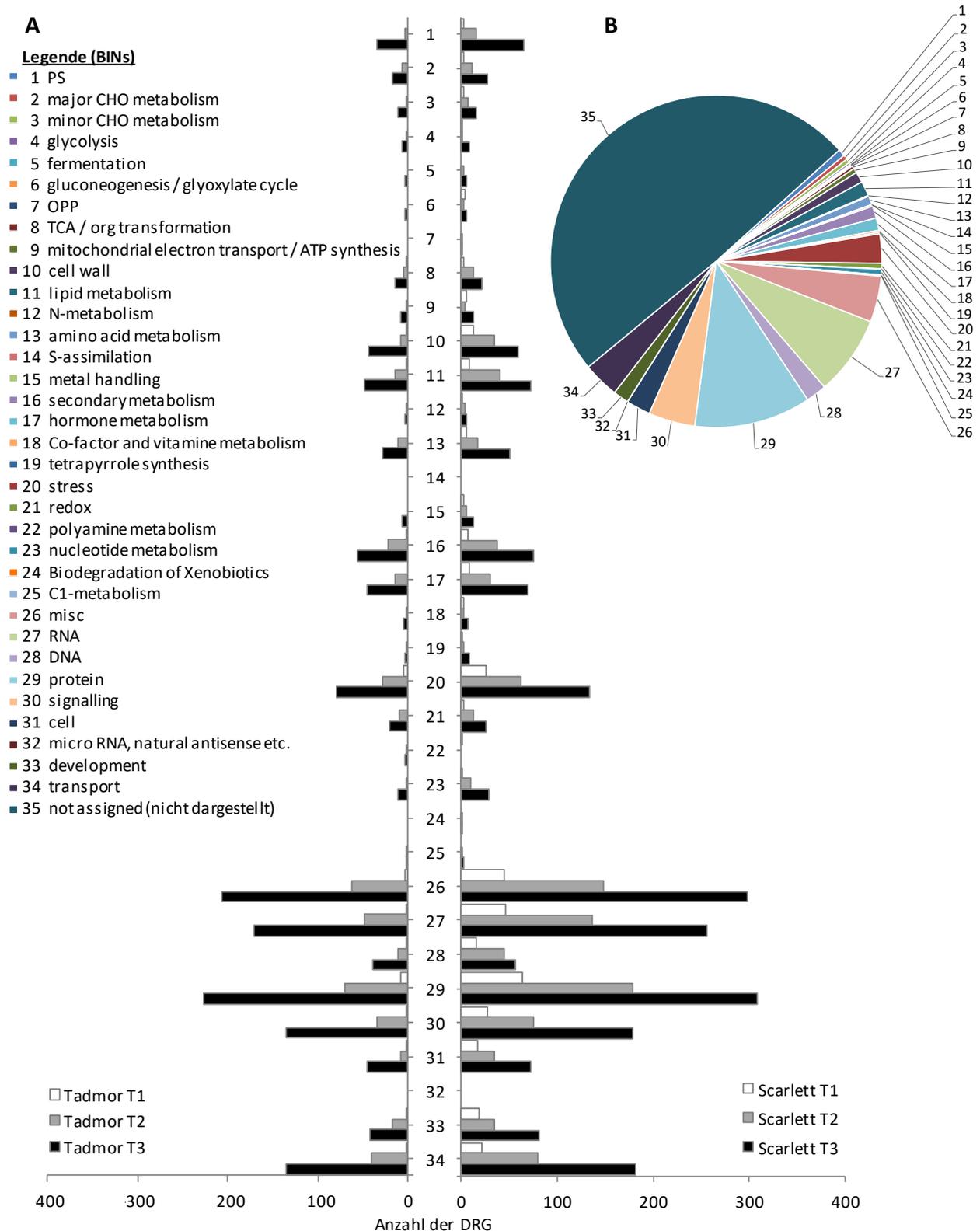


Abbildung 4.5 Übersicht aller differentiell regulierten Gene (DRG) in Scarlett und Tadmor im zeitlichen Verlauf des Trockenstress-Experiments. Die Anzahl der DRG resultierten aus dem Vergleich der Trockenstress-Stadien (T1, T2, T3) mit der Kontrolle (K1) für Scarlett (links), Tadmor (Mitte) und aus dem Vergleich von Tadmor mit Scarlett (T vs. S) unter Kontrollbedingungen (K1, rechts). Die Anzahl der induzierten (\log_2FC -Wert ≥ 2) und reprimierten (\log_2FC -Wert ≤ -2) Gene wurde unter Anwendung einer einfaktoriellem ANOVA (p -value ≤ 0.001) und FDR-Korrektur (Benjamini–Hochberg) ermittelt.

Um technische und biologische Schwankungen zu kontrollieren, werden für jeden Zeitpunkt drei Microarray-Analysen durchgeführt. Insgesamt werden 17.287 Gene mittels einfaktoriellem Varianzanalyse (ANOVA, p -value ≤ 0.001 , FDR-Korrektur Benjamini–Hochberg) als differentiell regulierte Gene (DRG) identifiziert. Diese Kriterien ergeben eine Anzahl von 6290 DRG. Alle auf diese Weise ermittelten DRG in Scarlett und Tadmor sind in Abbildung 4.5 für jedes Trockenstress-Stadium im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle (K1) und für den Vergleich von Tadmor mit Scarlett unter Kontrollbedingungen (K1) dargestellt. Im zeitlichen Verlauf des Trockenstresses nimmt die Anzahl der DRG in beiden Kultivaren zu, wobei die Mehrzahl der

Gene reprimiert ist. Während die physiologischen Daten zum Zeitpunkt T1 noch keinen Unterschied zwischen den Kultivaren aufzeigen (Abbildung 4.2), sind in Scarlett bereits 837 Gene, in Tadmor dagegen nur 56 Gene durch Trockenstress reguliert. Dieser Unterschied lässt sich vermutlich mit der verzögerten trockenstress-induzierten Blattseneszenz von Tadmor begründen. Zum Zeitpunkt T2 sind in beiden Kultivaren deutlich mehr Gene reguliert. Die Anzahl der DRG steigt in Scarlett auf 2211 (349 Gene induziert, 1862 Gene reprimiert). In Tadmor sind zu diesem Zeitpunkt 301 Gene induziert und 519 Gene reprimiert. Zum Zeitpunkt T3 sind in Scarlett insgesamt 4074 Gene reguliert, in Tadmor dagegen 2845 Gene. Der Vergleich beider Kultivare unter Kontrollbedingungen ergibt ebenfalls transkriptionelle Unterschiede. Im Vergleich zu Scarlett sind in Tadmor 414 Gene induziert und 648 Gene reprimiert. Für eine genaue Analyse werden anschließend alle DRG in 35 funktionelle BINs (Haupt-Gengruppen) mit der Software MAPMAN Version 3.5.1R2 klassifiziert (THIMM *et al.*, 2004).

Der BIN mit der größten Anzahl an Genen (2934 DRG) beinhaltet Gene die keiner Gengruppe zugeordnet werden können (*not assigned*). Die Aufteilung der DRG ist im Verlauf des Trockenstress-Experiments in Scarlett und Tadmor in Abbildung 4.6 dargestellt. Die Anzahl der DRG nimmt im Verlauf des Trockenstress-Experiments in beiden Kultivaren deutlich zu. Auch bei dieser detaillierten Analyse ist erkennbar, dass die Anzahl an DRG in Scarlett in jedem BIN zu jedem Zeitpunkt des Trockenstress-Experiments deutlich höher ist im Vergleich zu Tadmor. Die BINs mit der größten Anzahl an DRG zum Zeitpunkt T3 sind *misc* (verschiedene Enzymfamilien), *RNA*, *protein*, *signalling*, *stress* und *transport*. Diese Zuordnung ist abhängig von der Annotations-Verteilung auf dem Microarray (siehe Abbildung 4.6 A und B), was bei der Betrachtung berücksichtigt werden muss.



Die Identifizierung der Gene und Gengruppen, welche im Trockenstressgeschehen involviert und in beiden Kultivaren unterschiedlich reguliert sind, erfolgte in zwei Schritten. Im ersten Schritt wurden alle ermittelten DRGs in BINs und subBINs klassifiziert (USADEL *et.al.*, 2006). Anschließend wurden zum einen alle DRGs unter Trockenstress (T1-T3) in Scarlett und Tadmor im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle K1 erfasst und zum anderen alle DRGs in Tadmor im Vergleich zu Scarlett unter Kontrollbedingungen ermittelt. Die Aufteilung dieser DRGs ist in Tabelle 4.2 zusammengefasst. Im zweiten Schritt wurde überprüft, ob einzelne induzierte bzw. reprimierte Gengruppen zu bestimmten Zeitpunkten im Verlauf des Experiments besonders stark oder schwach in Scarlett und Tadmor reguliert sind. Die *overrepresentation analysis* (ORA) wurde mittels PAGEMAN Software-Tools durchgeführt. In Abbildung 4.7 sind alle über- und unterrepräsentierten BINs und subBINs dokumentiert, wobei im Folgenden die überrepräsentierten Gengruppen näher beleuchtet werden. Die Analyse zeigt gemeinsam und unterschiedlich regulierte Gengruppen in Scarlett und Tadmor in der frühen Trockenstress-Antwort (T1-T3).

In Scarlett sind zum Zeitpunkt T1 Gene der Prolin-Synthese (BIN 13.1.2.2) induziert. Zum Zeitpunkt T2 sind in beiden Kultivaren Gene der Proteinfamilie *protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein* (BIN 26.21) signifikant induziert. Dagegen sind zeitgleich Gene des Redoxsystems, besonders für das Enzym Glutaredoxin (BIN 21.4), signifikant reprimiert. Zum Zeitpunkt T3 sind folgende Gengruppen sowohl in Scarlett als auch in Tadmor überrepräsentiert. Die BINs Sekundärstoffwechsel (BIN 16), *miscellaneous* (BIN 26), *protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein* (BIN 26.21) und *transport* (BIN 34) sind in beiden Kultivaren signifikant induziert. Dagegen sind zum Zeitpunkt T3 in Scarlett und Tadmor Transkripte der Photosynthese, besonders des Photosystems II (BIN 1.1.1), und des Redoxsystems, Glutaredoxin (BIN 21.4) signifikant reprimiert. Unterschiede zwischen beiden Kultivaren zum Zeitpunkt T3 wurden für folgende BINs festgestellt. In Scarlett sind zum Zeitpunkt T3 Gene, welche in Degradationsprozesse von Lipiden (BIN 11.9), Aminosäuren (BIN 13.2), Nukleotiden (BIN 23.2), in der abiotischen Stressantwort (BIN 20.2) und in unspezifischen Entwicklungsprozessen (BIN 33.99) involviert sind, deutlich mehr induziert als in Tadmor. Weiterhin sind in Scarlett zu diesem Zeitpunkt Gene, die für Cytochrom-P450-Monooxygenasen codieren, überwiegend reprimiert. In Tadmor sind zum Zeitpunkt T3 die kleine Gengruppe der Polyamin-Oxidasen (BIN 22.2.1) und Gene des Aminosäure-Transportes (BIN 34.3) signifikant induziert.

Die letzte Spalte der Abbildung 4.7 zeigt alle überrepräsentierten BINs in Tadmor im Vergleich zu Scarlett unter Kontrollbedingungen. In diesem Fall sind interessanterweise in Tadmor DRGs der

biotischen Stressantwort (BIN 20.1) mehrheitlich induziert. Dagegen sind einige DRGs des Sekundärstoffwechsels, genauer der Isoprenoide (BIN 16.1), deutlich reprimiert. Weiterhin sind überdurchschnittlich viele Rezeptorkinasen-codierende Gene (z.B. *DUF 26*, *wheat LRK10-like*, *wall associated kinase*) signifikant reprimiert (BIN 30.2). Die DUF26 (*Domain of Unknown Function 26*) Genfamilie, auch bekannt als *Cysteine-rich Receptor-like/Pelle kinases* (CRKs), gehören zur großen Gruppe der *Receptor-like kinases* (RLKs). Sie regulieren pflanzliche Enzwicklungsprozesse und sind in der biotischen und abiotischen Stressantwort involviert (SHIU & BLEECKER, 2001).

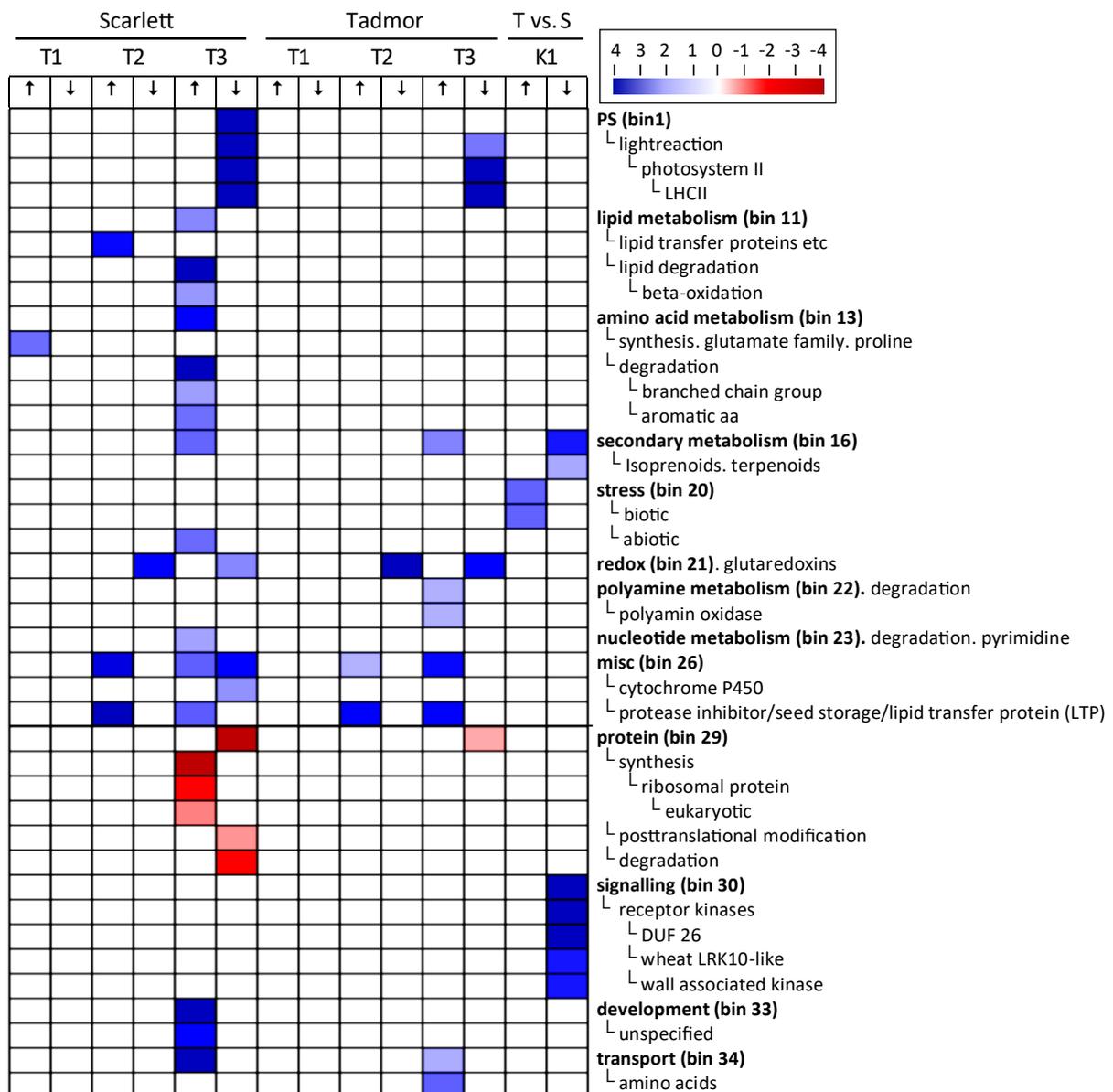


Abbildung 4.7 Overrepresentation analysis (ORA) der DRG in Scarlett und Tadmor im Verlauf des Trockenstressexperiments. Die Ergebnisse resultierten aus dem Vergleich der Trockenstress-Stadien (T1, T2, T3) mit der Kontrolle (K1) für Scarlett (links), Tadmor (Mitte) und aus dem Vergleich von Tadmor mit Scarlett (T vs. S) unter Kontrollbedingungen (K1, rechts). Die induzierten (↑) und reprimierten (↓) Gene wurden für jedes Stadium mittels PAGEMAN Software-Tool analysiert (Fisher's exact test, ORA cut-off value 2, Benjamini-Hochberg-Korrektur). Eine Falsch-Farben Skala von 4 wurde gewählt (Z-value). Blau signalisiert eine signifikante Überrepräsentation, Rot eine signifikante Unterrepräsentation der jeweiligen funktionellen BINs und subBINs, die funktionell annotiert sind (rechts).

Tabelle 4.2 Fortsetzung

bin	bin + subbin	N	↑ Scarlett						↑ Tadmor			↑ T vs.S			↓ Scarlett			↓ Tadmor			↓ T vs.S			
			T1	T2	T3	T1	T2	T3	T1	T2	T3	T1	T2	T3	T1	T2	T3	T1	T2	T3	K1			
16.4	N misc	9	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	2	2	0	1	2	0	1	2	0	0	0	
16.5	sulfur-containing	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	2	0	0	0	
16.7	wax	9	0	1	2	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	
16.8	flavonoids	64	0	3	7	0	4	6	6	6	3	5	8	0	1	5	5	3	5	8	0	1	5	
16.10	simple phenols	17	0	1	4	1	4	4	0	0	2	2	5	0	1	2	4	2	2	5	0	1	2	
17	hormone metabolism																							
17.1	abscisic acid	34	0	1	4	0	3	3	1	1	0	2	9	0	0	0	6	0	0	6	0	0	0	
17.2	auxin	53	0	3	6	0	2	4	0	0	2	5	7	0	1	5	2	5	7	0	1	5	6	
17.3	brassinosteroid	11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	
17.4	cytokinin	18	0	0	2	0	0	0	0	0	1	2	4	0	2	6	0	1	2	4	0	2	6	0
17.5	ethylene	61	0	1	9	0	0	3	0	0	1	7	13	0	1	9	4	1	7	13	0	1	9	4
17.6	gibberelin	22	1	2	3	0	2	2	1	1	1	3	4	0	1	2	0	1	3	4	0	1	2	0
17.7	jasmonate	25	0	0	3	0	0	1	2	2	2	4	4	0	2	4	0	2	4	4	0	2	4	0
17.8	salicylic acid	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
18	Co-factor and vitamine metabolism	35	0	1	2	0	1	2	1	1	2	2	5	0	0	4	0	2	2	5	0	0	4	0
19	tetrapyrrole synthesis	33	0	0	2	0	0	0	1	1	1	2	7	0	1	3	0	1	2	7	0	1	3	0
20	stress																							
20.1	biotic	386	1	6	22	4	7	12	23	19	36	61	19	1	11	32	19	36	61	1	11	32	30	
20.2	abiotic	7	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	0	0	0	0	1	2	0	0
20.2.1	abiotic.heat	79	0	2	10	0	2	8	2	2	7	8	2	0	3	10	2	7	8	0	3	10	3	
20.2.2	abiotic.cold	20	0	2	3	0	1	1	1	1	2	1	1	0	0	1	1	1	2	1	0	1	1	
20.2.3	abiotic.drought/salt	28	0	0	6	0	0	2	0	0	1	5	0	0	0	2	0	0	1	5	0	0	0	
20.2.4	abiotic.touch/wounding	8	0	0	0	0	0	0	0	2	3	5	0	0	0	2	0	2	3	5	0	0	0	
20.2.5	abiotic.light	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	
20.2.99	abiotic.unspecified	36	0	0	6	0	0	3	3	1	3	4	1	0	3	4	1	3	4	0	3	4	3	
21	redox	89	0	0	5	0	0	1	0	3	13	21	3	0	10	19	3	13	21	0	10	19	1	
22	polyamine metabolism																							
22.1	synthesis	8	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	
22.2	degradation	4	0	0	0	0	2	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
23	nucleotide metabolism																							
23.1	synthesis	25	0	0	1	0	0	0	1	0	2	2	0	0	0	2	0	0	2	2	0	0	0	
23.2	degradation	27	0	1	7	0	0	0	0	0	3	8	0	0	1	2	0	0	3	8	0	1	2	
23.3	salvage	11	0	0	0	0	0	0	0	1	2	2	0	0	1	1	0	1	2	2	0	1	0	
23.4	phosphotransfer and pyrophosphatases	20	0	1	4	0	0	3	1	0	0	3	0	0	0	2	1	0	0	3	0	0	1	
23.5	deoxynucleotide metabolism	10	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	
24	Biodegradation of Xenobiotics	12	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	
25	C1-metabolism	16	0	0	1	0	0	1	0	0	1	2	0	0	2	1	1	0	1	2	0	2	1	
26	misc	913	5	44	95	2	34	60	25	40	104	204	40	1	28	146	54	104	204	1	28	146	54	
27	RNA																							
27.1	processing	149	0	0	4	0	2	4	7	3	7	14	3	0	0	6	3	7	14	0	0	6	3	
27.2	transcription	90	1	1	1	0	0	2	2	2	6	13	2	0	3	6	2	6	13	0	3	6	2	

Tabelle 4.2 Fortsetzung

bin	bin + subbin	N	↑ Scarlett			↑ Tadmor			↑ T vs.S			↓ Scarlett			↓ Tadmor			↓ T vs.S				
			T1	T2	T3	T1	T2	T3	T1	T2	T3	T1	T2	T3	T1	T2	T3	T1	T2	T3	K1	
27.3	regulation of transcription	896	2	19	57	0	12	24	0	12	24	19	35	95	154	2	30	119	23			
27.4	RNA binding	79	0	0	3	0	1	3	0	1	3	3	3	8	10	0	0	7	1			
28	DNA																					
28.1	synthesis/chromatin structure	220	1	3	8	0	1	5	0	1	5	6	10	27	33	1	4	25	7			
28.2	repair	49	1	2	2	0	0	0	0	0	0	0	3	10	9	1	6	8	4			
28.99	unspecified	40	0	0	1	0	0	0	0	0	0	3	1	2	3	0	1	2	3			
29	protein																					
29.1	aa activation	60	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	5	3	0	4	6	1			
29.2	synthesis	321	0	1	2	1	2	5	4	4	4	4	16	28	37	1	5	22	9			
29.3	targeting	141	0	1	2	1	1	0	1	1	0	1	6	16	16	1	5	16	9			
29.4	postranslational modification	400	2	12	43	0	11	22	10	11	22	10	7	28	41	1	10	48	14			
29.5	degradation	752	3	17	70	0	10	23	19	10	23	19	26	67	83	3	22	77	32			
29.6	folding	31	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	2	2	3	0	0	4	3			
29.7	glycosylation	29	0	0	0	0	0	0	2	2	0	2	2	2	5	0	0	2	1			
29.8	assembly and cofactor ligation	9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0			
30	signalling																					
30.1	in sugar and nutrient physiology	26	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	2	5	0	0	8	1			
30.2	receptor kinases	277	0	3	14	0	3	7	9	3	7	9	5	26	59	1	11	46	28			
30.2.17	receptor kinases: DUF 26	229	0	4	15	0	7	10	16	7	10	16	4	10	35	1	6	24	36			
30.3	calcium	102	0	0	6	0	2	6	7	2	6	7	6	7	10	0	1	7	5			
30.4	phosphinositides	32	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	2	5	0	2	4	0			
30.5	G-proteins	103	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	8	13	12	0	2	13	1			
30.6	MAP kinases	16	0	2	2	0	0	1	1	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0			
30.7	14-3-3 proteins	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0			
30.10	phosphorelay	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
30.11	light	70	0	1	3	0	0	1	3	0	1	3	0	3	8	0	0	5	6			
30.99	unspecified	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0			
31	cell																					
31.1	organisation	229	0	2	15	0	3	4	5	3	4	5	7	18	31	0	2	24	5			
31.2	division	46	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	2	3	0	0	3	1			
31.3	cycle	46	0	1	2	0	1	3	1	1	3	1	3	6	9	0	2	5	0			
31.4	vesicle transport	78	1	0	2	0	0	0	1	0	0	1	5	6	9	1	1	7	4			
31.5	cell death	2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1			
33	development																					
33.1	storage proteins	26	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	2	5	4	0	2	4	1			
33.2	late embryogenesis abundant	15	0	3	5	0	3	4	0	3	4	0	1	2	1	0	0	1	0			
33.3	squamosa promoter binding like (SPL)	3	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0			
33.30	multitarget	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	0	1	2	0			
33.99	unspecified	209	0	6	33	0	3	9	7	3	9	7	14	16	30	1	9	22	5			
34	transport																					
34	transport.others	561	2	18	73	0	11	30	14	11	30	14	18	46	82	1	20	81	20			
34.3	transport.amino acids	81	0	5	13	0	4	12	1	4	12	1	2	10	13	0	6	12	7			
35	not assigned	8403	21	137	452	5	130	250	172	130	250	172	462	1026	1476	22	254	1133	250			

4.2.3 Vergleichende Genexpressionsanalysen ausgewählter Gengruppen

Die Microarray-Analysen zeigen, dass zahlreiche Gene, welche für funktionelle Proteine codieren, in Scarlett und Tadmor unterschiedlich stark unter Trockenstress reguliert sind. Um herauszufinden, welche regulatorischen Genprodukte die trockenstress-induzierte Blattseneszenz beeinflussen, wird im Folgenden die große Gruppe der Transkriptionsregulatoren (BIN 27.3) genauer analysiert. Polyamine spielen in Entwicklungsprozessen und der Anpassung an biotische und abiotische Stressbedingungen eine wichtige Rolle (KUSANO *et al.*, 2008; HUSSAIN *et al.*, 2011). Dabei wird ein enger Zusammenhang zwischen dem Abbau der Polyamine und der Signal-Wirkung im Trockenstress vermutet (MOSCHOU *et al.*, 2008). Die PAOs sind in Tadmor unter Trockenstress signifikant induziert und werden deshalb neben den Transkriptionsregulatoren als zweite Kandidaten-Gruppe genauer untersucht.

4.2.3.1 Transkriptionsregulatoren (TR)

TR spielen eine zentrale Rolle in der pflanzlichen Trockenstress-Antwort. Insgesamt sind 896 TR differentiell reguliert. Die Anzahl der induzierten und reprimierten TR in Scarlett und Tadmor unter Kontroll- und Trockenstressbedingungen ist in Abbildung 4.8 dargestellt.

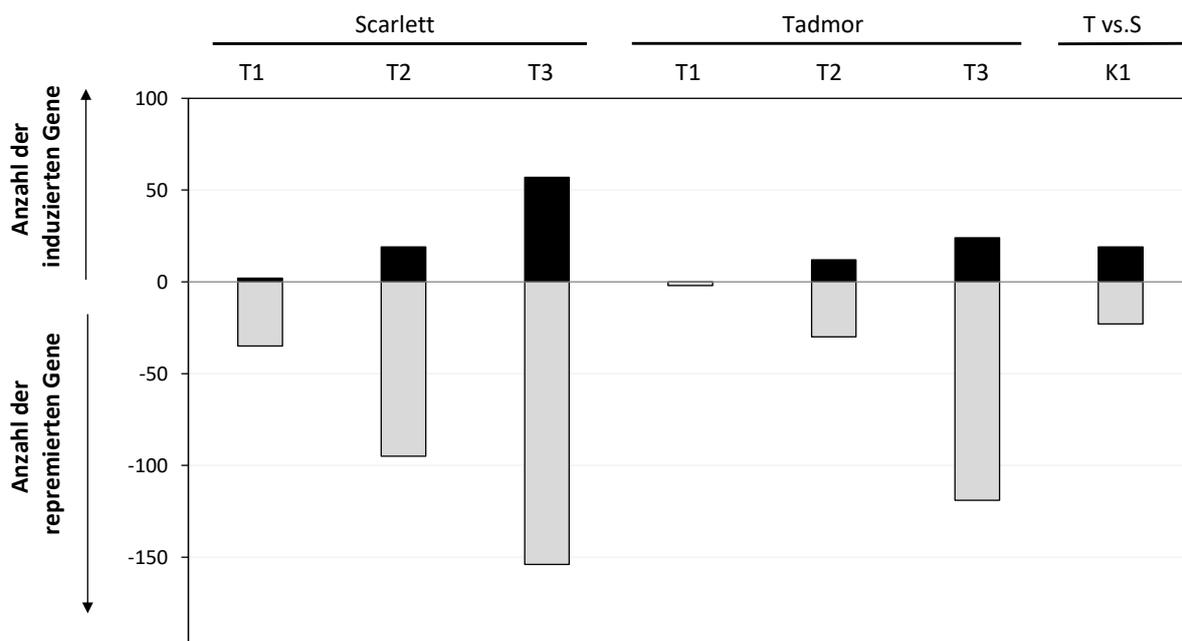


Abbildung 4.8 Übersicht aller differentiell regulierter TR in Scarlett und Tadmor im zeitlichen Verlauf des Trockenstress-Experiments. Die Anzahl der DRG resultiert aus dem Vergleich der Trockenstress-Stadien (T1, T2, T3) mit der Kontrolle (K1) für Scarlett (links), Tadmor (Mitte) und aus dem Vergleich von Tadmor mit Scarlett (T vs. S) unter Kontrollbedingungen (K1, rechts). Die Anzahl der induzierten (\log_2FC -Wert ≥ 2) und reprimierten (\log_2FC -Wert ≤ -2) Gene wurde unter Anwendung einer einfaktoriellen ANOVA (p -value ≤ 0.001) und FDR-Korrektur (Benjamini-Hochberg) ermittelt.

Im zeitlichen Verlauf des Trockenstress-Experiments nimmt die Anzahl der regulierten TR in Scarlett und Tadmor zu. So steigt die Anzahl der regulierten TR bis zum Zeitpunkt T3 in Scarlett von 37 auf 211, in Tadmor von 2 auf 143. Die Mehrzahl der Gene ist in beiden Kultivaren reprimiert. Beim Vergleich von Tadmor und Scarlett unter Kontrollbedingungen sind 19 TR induziert und 23 TR reprimiert.

Cluster-Analyse

Um das Expressionsmuster der einzelnen TR im Trockenstress-Verlauf in Scarlett und Tadmor zu vergleichen werden Clusteranalysen mit Hilfe von Microsoft Excel 2010 wie folgt durchgeführt. Alle TR werden nach ihrem Expressionsmuster im Verlauf des Trockenstress-Experiments analysiert und sortiert. Dadurch können Gene identifiziert werden, welche vom Kontrollstadium (K1) über die einzelnen Trockenstress-Stadien T1, T2 und T3 eine stetige Induktion, Repression oder keine Regulation in einem oder beiden Kultivaren zeigen. Ein Gen gilt im Verlauf des Trockenstress-Experiments als induziert, wenn sein log₂FC-Wert vom Zeitpunkt K1 bis T3 einen Wert von 1 übersteigt (log₂FC-Wert ≥ 1). Sinkt der log₂FC-Wert eines Gens im Trockenstress-Verlauf dagegen um mehr als 1, (log₂FC-Wert ≤ -1) gilt es als reprimiert. Liegt die Genregulation zwischen diesen festgelegten Werten (log₂FC-Werte ≥ -1 ∧ ≤ 1), gilt das Gen als nicht bzw. transient reguliert. Durch diese Festlegung werden alle DRGs in 8 Cluster gruppiert, welche nach der Tendenz der Genregulation unter dem Einfluss von Trockenstress definiert werden (Tabelle 4.3). Die Aufteilung aller TR in 8 Cluster ist in Abbildung 4.9 dargestellt.

Tabelle 4.3 Definition und Einteilung der Cluster. Einteilung aller TR in 8 Cluster entsprechend ihres Expressionsmusters im Trockenstress-Verlauf (T1, T2, T3) für Scarlett und Tadmor. Es gilt: log₂FC-Werte ≥ 1 induziert (↑), log₂FC-Werte ≤ -1 reprimiert (↓), log₂FC-Werte ≥ -1 ∧ ≤ 1 nicht reguliert (-) (Cluster 1-7). Cluster 8 umfasst alle transient regulierten Gene (±).

Cluster	1	2	3	4	5	6	7	8
Beispiel								
Regulation	induziert			reprimiert			keine	transient
Scarlett	↑	↑	-	↓	↓	-	-	±
Tadmor	↑	-	↑	↓	-	↓	-	±

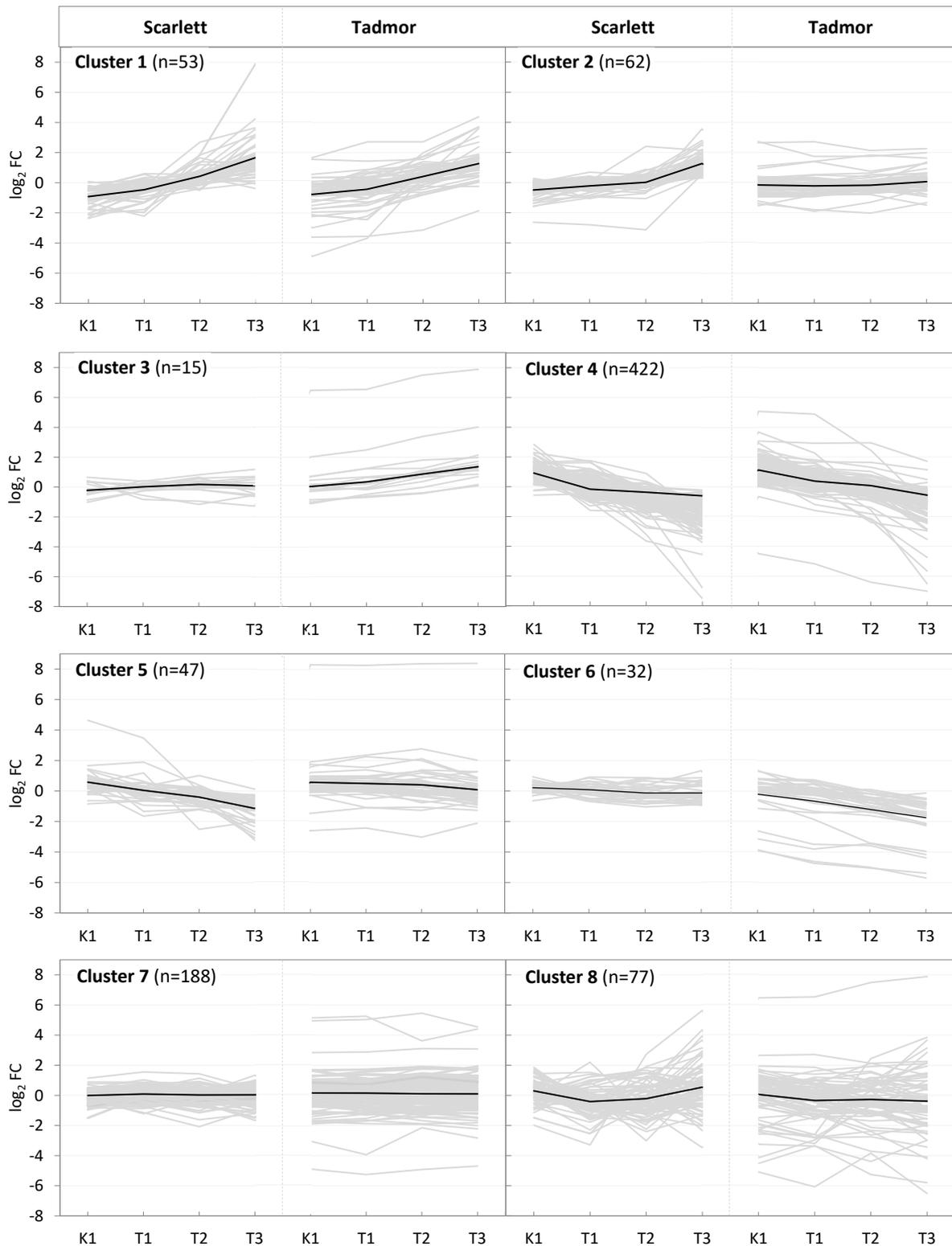


Abbildung 4.9 Cluster-Analyse von 869 identifizierten TR zu den einzelnen Stadien des Trockenstress-Experiments für Scarlett (links) und Tadmor (rechts). Die Expressionsrate ($\log_2 FC$ -Wert) der einzelnen TR ist in Abhängigkeit der Trockenstress-Stadien (K1, T1, T2, T3) dargestellt. Die mittlere Regulation ist für jedes Cluster als schwarze Linie markiert. n = Anzahl der regulierten Gene in einem Cluster.

Gene mit einem ähnlichen Expressionsprofil in beiden Kultivaren befinden sich in Cluster 1 (induziert) und Cluster 4 (reprimiert). Weiterhin werden Gene identifiziert, die im Verlauf des Trockenstress-Experiments nur in Scarlett oder in Tadmor induziert bzw. reprimiert sind (Cluster 2, 3 5 und 6). Cluster 7 impliziert TR, welche durch den Einfluss von Trockenstress nicht reguliert sind. Und letztlich umfasst Cluster 8 alle TR, mit einer transienten Regulation unter Trockenstressbedingungen. Cluster 7 und 8 werden bei der folgenden detaillierten Analyse vernachlässigt.

Alle regulierten TR eines jeden Clusters werden ihren jeweiligen Gen-Familien zugeordnet und auf ihre Überrepräsentation analysiert (Tabelle 4.3). Die Cluster-Analyse ergab weiterhin, dass im Trockenstress-Verlauf etwa die Hälfte aller TR in Scarlett und Tadmor reprimiert sind (Cluster 4, n=422). Dabei sind etwa 80% der Gene der ARR-Genfamilie (10 von 12) signifikant reprimiert. Ebenso mehrheitlich reprimiert, jedoch nicht überrepräsentiert, sind Mitglieder der Genfamilien Argonaute (4 von 6), AS2 (3 von 4), B3 (8 von 13), C2C2(Zn) CO-like (9 von 15), C2C2(Zn) YABBY (3 von 4), CCAAT-HAP5 (4 von 6), *Chromatin Remodeling Factors* (24 von 43), *DNA Methyltransferases* (7 von 12), E2F/DP (3 von 5), Jumnonji (8 von 13) und TCB (5 von 6). Im Cluster 5 (n=47) befinden sich 4 C2H2, 4 SET und 3 WRKY Genfamilien-Mitglieder, die nur in Scarlett reprimiert sind. Vergleichend dazu sind 3 AP2/EREBP, 4 bHLH und 2 GRAS Genfamilien-Mitglieder nur in Tadmor reprimiert (Cluster 6, n=32).

Alle trockenstress-induzierten TR finden sich in Cluster 1, 2 und 3 wie folgt wieder. Mitglieder der Genfamilien HSF (4 von 8), Jumonji (3 von 13) und CCAAT-HAP2 (2 von 3) sind in beiden Kultivaren signifikant induziert (Cluster 1, n=53). 4 bHLH, 2 C2C2(Zn) DOF, 3 *Chromatin Remodeling Factors*, 3 GARP, 3HB, 2 NIN-like und 2 SET Genfamilien-Mitglieder sind nur in Scarlett induziert (Cluster 2, n=62). In diesem Cluster konnten weiterhin Mitglieder der Familien GRAS (4 von 19) und HDA (3 von 12) als signifikant induziert bestimmt werden. Unter den wenigen Genen, die nur in Tadmor induziert sind (Cluster 3, n=15), ist die CCAAT-HAP2 Familie signifikant induziert.

Tabelle 4.4 Overrepresentation analysis (ORA) der TR-Familien der Cluster 1-8.

Genfamilie	N	C1		C2		C3		C4		C5		C6		C7		C8	
		n	p	n	p	n	p	n	p	n	p	n	p	n	p	n	p
ABI3/VP1	1	0	1.00	0	1.00	0	1.00	1	0.47	0	1.00	0	1.00	0	1.00	0	1.00
AP2/EREBP	27	2	0.48	3	0.29	1	0.37	9	0.95	0	1.00	3	0.07	6	0.51	3	0.41
ARF	10	2	0.11	1	0.51	0	1.00	4	0.78	1	0.42	1	0.31	1	0.91	0	1.00
Argonaute	6	1	0.31	0	1.00	0	1.00	4	0.29	0	1.00	0	1.00	1	0.76	0	1.00
ARR	12	0	1.00	0	1.00	0	1.00	10	1.12E-02*	0	1.00	0	1.00	2	0.75	0	1.00
AS2	4	0	1.00	0	1.00	0	1.00	3	0.27	0	1.00	0	1.00	1	0.61	0	1.00
AT-rich	1	0	1.00	0	1.00	0	1.00	1	0.47	0	1.00	0	1.00	0	1.00	0	1.00
AtSR	6	0	1.00	0	1.00	0	1.00	2	0.86	0	1.00	0	1.00	2	0.37	2	0.09
Aux/IAA	4	0	1.00	1	0.25	0	1.00	0	1.00	1	0.19	0	1.00	0	1.00	2	3.90E-02*
B3	13	0	1.00	0	1.00	0	1.00	8	0.22	1	0.51	2	0.08	1	0.95	1	0.69
bHLH	43	3	0.47	4	0.35	0	1.00	23	0.24	0	1.00	4	0.06	6	0.92	3	0.73
bZIP	30	2	0.54	3	0.34	1	0.40	13	0.73	1	0.81	1	0.67	6	0.63	3	0.48
C2C2(Zn) CO-like	15	1	0.60	1	0.66	0	1.00	9	0.23	1	0.56	0	1.00	3	0.64	0	1.00
C2C2(Zn) DOF	8	1	0.39	2	0.10	0	1.00	1	0.99	0	1.00	1	0.25	3	0.22	0	1.00
C2C2(Zn) GATA	8	0	1.00	0	1.00	0	1.00	3	0.82	1	0.35	1	0.25	1	0.85	2	0.15
C2C2(Zn) YABBY	4	1	0.22	0	1.00	0	1.00	3	0.27	0	1.00	0	1.00	0	1.00	0	1.00
C2H2	33	4	0.12	0	1.00	0	1.00	12	0.93	4	0.09	0	1.00	8	0.39	5	0.15
C3H	8	0	1.00	1	0.44	1	0.13	3	0.82	1	0.35	1	0.25	1	0.85	0	1.00
Zn-finger(CCHC)	1	0	1.00	0	1.00	0	1.00	0	1.00	0	1.00	0	1.00	1	0.21	0	1.00
CCAAT-DR1	2	0	1.00	0	1.00	0	1.00	2	0.22	0	1.00	0	1.00	0	1.00	0	1.00
CCAAT-HAP2	3	2	9.92E-03*	0	1.00	1	4.94E-02*	0	1.00	0	1.00	0	1.00	0	1.00	0	1.00
CCAAT-HAP3	4	1	0.22	0	1.00	0	1.00	2	0.64	0	1.00	0	1.00	0	1.00	1	0.30
CCAAT-HAP5	6	1	0.31	0	1.00	0	1.00	4	0.29	0	1.00	1	0.20	0	1.00	0	1.00
Chromatin Remodeling	43	2	0.74	3	0.58	0	1.00	24	0.15	1	0.91	0	1.00	12	0.17	1	0.98
CPP(Zn)	3	0	1.00	0	1.00	0	1.00	1	0.85	0	1.00	0	1.00	0	1.00	2	2.07E-02*
DNA methyltransferases	12	0	1.00	0	1.00	0	1.00	7	0.31	0	1.00	1	0.36	2	0.75	2	0.28
E2F/DP	5	0	1.00	0	1.00	0	1.00	3	0.45	0	1.00	0	1.00	2	0.28	0	1.00
EIL	1	0	1.00	0	1.00	0	1.00	1	0.47	0	1.00	0	1.00	0	1.00	0	1.00
FHA	3	0	1.00	0	1.00	0	1.00	2	0.46	0	1.00	0	1.00	1	0.51	0	1.00
GARP	18	1	0.67	3	0.12	0	1.00	9	0.49	1	0.62	0	1.00	2	0.92	2	0.47
GeBP	2	0	1.00	0	1.00	0	1.00	1	0.72	0	1.00	0	1.00	1	0.38	0	1.00
General Transcription	7	1	0.35	0	1.00	1	0.11	3	0.72	1	0.32	0	1.00	1	0.81	0	1.00
General Transcription, TBP	2	0	1.00	0	1.00	0	1.00	2	0.22	0	1.00	0	1.00	0	1.00	0	1.00
Global transcription	6	0	1.00	1	0.35	0	1.00	2	0.86	0	1.00	0	1.00	3	0.11	0	1.00
GRAS	19	1	0.69	4	3.67E-02*	1	0.28	7	0.87	0	1.00	2	0.14	1	0.99	3	0.22
HB	30	1	0.84	3	0.34	0	1.00	15	0.44	1	0.81	2	0.29	6	0.63	2	0.75
HDA	12	0	1.00	3	4.43E-02*	0	1.00	5	0.75	0	1.00	0	1.00	2	0.75	2	0.28
Histone acetyltransferases	8	0	1.00	0	1.00	0	1.00	4	0.57	1	0.35	0	1.00	3	0.22	0	1.00
HSF	8	4	6.42E-04*	0	1.00	0	1.00	1	0.99	1	0.35	0	1.00	2	0.53	0	1.00
JUMONJI	13	3	3.67E-02*	0	1.00	0	1.00	8	0.22	0	1.00	0	1.00	1	0.95	1	0.69
MADS	24	2	0.42	1	0.83	0	1.00	11	0.63	0	1.00	1	0.59	4	0.78	5	4.77E-02*
Methyl binding	5	0	1.00	0	1.00	0	1.00	2	0.77	1	0.24	1	0.17	1	0.69	0	1.00
MYB	40	3	0.43	3	0.53	1	0.50	19	0.54	3	0.35	1	0.77	6	0.88	4	0.46
MYB-related	24	2	0.42	1	0.83	1	0.34	12	0.47	1	0.73	1	0.59	5	0.59	1	0.89
NAC	4	1	0.22	0	1.00	0	1.00	1	0.92	0	1.00	0	1.00	1	0.61	1	0.30
NIN-like	11	0	1.00	2	0.17	0	1.00	1	1.00	1	0.45	2	0.06	4	0.18	1	0.63
Nucleosome/chromatin	6	0	1.00	0	1.00	1	0.10	0	1.00	1	0.28	0	1.00	2	0.37	2	0.09
Orphan	2	0	1.00	0	1.00	0	1.00	0	1.00	1	0.10	0	1.00	1	0.38	0	1.00
PHD	10	0	1.00	1	0.51	0	1.00	5	0.55	0	1.00	1	0.31	3	0.35	0	1.00
PHOR1	1	0	1.00	0	1.00	0	1.00	0	1.00	0	1.00	0	1.00	0	1.00	1	0.09
PcG	2	0	1.00	0	1.00	0	1.00	2	0.22	0	1.00	0	1.00	0	1.00	0	1.00
Pseudo ARR	3	0	1.00	0	1.00	0	1.00	1	0.85	0	1.00	0	1.00	2	0.11	0	1.00
putative	84	6	0.38	3	0.94	3	0.16	45	0.13	4	0.66	2	0.82	15	0.81	6	0.75
PWWP	2	0	1.00	0	1.00	0	1.00	0	1.00	0	1.00	0	1.00	2	4.38E-02*	0	1.00
regulation of transcription	6	1	0.31	1	0.35	0	1.00	0	1.00	1	0.28	1	0.20	2	0.37	0	1.00
SBP	1	0	1.00	0	1.00	0	1.00	0	1.00	0	1.00	0	1.00	1	0.21	0	1.00
SET	30	0	1.00	2	0.63	0	1.00	11	0.91	4	0.07	0	1.00	9	0.16	4	0.25
Silencing Group	1	0	1.00	0	1.00	0	1.00	1	0.47	0	1.00	0	1.00	0	1.00	0	1.00
SNF7	7	0	1.00	1	0.40	0	1.00	3	0.72	0	1.00	0	1.00	2	0.45	1	0.47
TCP	6	0	1.00	0	1.00	0	1.00	5	0.08	0	1.00	0	1.00	1	0.76	0	1.00
TAZ	1	0	1.00	0	1.00	0	1.00	1	0.47	0	1.00	0	1.00	0	1.00	0	1.00
Trihelix	6	0	1.00	0	1.00	0	1.00	3	0.60	0	1.00	0	1.00	2	0.37	1	0.42
TUB	1	0	1.00	0	1.00	0	1.00	1	0.47	0	1.00	0	1.00	0	1.00	0	1.00
unclassified	156	3	1.00	12	0.39	2	0.77	76	0.36	10	0.29	2	0.98	40	0.07	11	0.82
WRKY	19	0	1.00	2	0.38	1	0.28	8	0.75	3	0.07	0	1.00	3	0.80	2	0.50
zf-HD	3	1	0.17	0	1.00	0	1.00	2	0.46	0	1.00	0	1.00	0	1.00	0	1.00

Der Fisher's exact test ergab folgende p -values (p), wobei Genfamilien mit $p \leq 0.05$ gekennzeichnet wurden (*). Bei einer Gesamtzahl von 896 TR ist (N) die Anzahl aller determinierten TR einer Genfamilie und (n) die Anzahl aller regulierten TR einer Genfamilie.

Die Cluster-Analyse ermöglicht eine Einteilung aller TR hinsichtlich ihrer Expressionsmuster unter dem Einfluss von Trockenstress. Bei der detaillierten Analyse der einzelnen Cluster ergeben sich starke Unterschiede zwischen beiden Kultivaren. Zum einen im Hinblick auf die Stärke der Genregulation im Verlauf des Trockenstress-Experiments und andererseits auf den relativen Transkriptgehalt unter Kontrollbedingungen. Durch ein Ranking werden alle TR nach diesen zwei Aspekten geordnet. Mit dieser Methode wurden daraufhin Kandidaten-Gene mit den größten Genexpressionsunterschieden zwischen beiden Kultivaren für jedes Cluster identifiziert. Die Verifizierung einiger ausgewählter Kandidaten-Gene erfolgte mittels qRT-PCR. Der Expressionsverlauf der einzelnen Gene ist in den folgenden Diagrammen dargestellt. In Ergänzung dazu werden die ermittelten Ct-Werte für Scarlett und Tadmor unter Trockenstress und Kontrollbedingungen im Verlauf des Experiments dokumentiert.

Cluster 1

Cluster 1 umfasst 53 TR, die im Verlauf des Trockenstress-Experiments in Scarlett und Tadmor induziert sind. Dabei sind starke Unterschiede im relativen Transkriptlevel unter Kontrollbedingungen (K1) zwischen beiden Kultivaren erkennbar. Tabelle 4.5 (oben) zeigt, dass das Transkriptlevel von fünf Kandidaten-Genen (C2C2(Zn) Co-like, Jumonji, MADS, bZIP und HSF) zu diesem Zeitpunkt in Tadmor höher ist als in Scarlett.

Tabelle 4.5 Kandidaten-Gene (TR) Cluster 1 (n=53).

	Nr.	TargetID ^a	Genfamilie ^b	Hv Acc. No. ^c	TAIR10 ^d	Scarlett				Tadmor				T vs.S
						K1	T1	T2	T3	K1	T1	T2	T3	K1-K1
Cluster 1	1	hv_12465	C2C2(Zn) CO-like	AK358383	LZF1	-1.24	-0.54	-0.17	0.90	1.55	1.43	1.55	3.08	2.79
	2	hv_08875*	JUMONJI	AK372811	JMJD5	-1.12	-0.92	-0.18	3.22	1.65	2.71	2.71	4.37	2.77
	3	hv_00166	MADS	AK370468	AGL12	-2.04	-0.68	0.76	-0.08	0.09	0.21	1.40	1.20	2.13
	4	hv_06547	bZIP	AK372715	BZIP53	-1.42	-0.05	0.44	0.53	0.55	0.88	1.11	1.89	1.97
	5	hv_11941	HSF	AK353849	HSFC1	-2.12	-1.78	0.44	2.47	-0.28	0.83	1.75	3.70	1.83
	1	hv_11238*	unbekannt	AK362981	-	-1.34	-2.22	0.85	3.57	-4.90	-3.69	0.29	3.59	-3.57
	2	hv_07632	bHLH	AK365903	BHLH92	-0.29	0.10	-0.50	2.55	-3.62	-3.56	-3.14	-1.86	-3.32
	3	hv_39072	NAC	AK365812	NAC2	-0.84	-1.29	1.31	4.25	-3.00	-2.23	0.14	2.38	-2.16
	4	hv_20958	AP2/EREBP	AK368254	Rap2.6L	-0.24	-0.41	0.61	3.05	-1.96	-1.87	-0.82	0.03	-1.72
	5	hv_00892	JUMONJI	-	-	-0.54	0.34	0.44	1.23	-2.25	-1.87	-0.65	0.14	-1.71

Relatives Expressionslevel (log₂FC-Wert) von Kandidaten-Genen (TR) im Verlauf des Trockenstress-Experiments (K1, T1, T2, T3) in Scarlett und Tadmor. log₂FC-Wert zum Zeitpunkt K1 höher in Tadmor (oben), höher in Scarlett (unten). ^aProbe auf dem Agilent 60K-Microarray, ^bGenfamilie (MAPMAN), ^cGenBank *accession no.* *Hordeum vulgare*, ^dGen-Annotation *Arabidopsis thaliana* (TAIR10) *markierte Gene für detaillierte Expressionsanalysen (qRT-PCR).

Die Jumonji-Genfamilie ist in Cluster 1 überrepräsentiert. Für die genaue Expressionsanalyse wird daher der Jumonji-TR (AK372811) ausgewählt, welcher dem Gen *AtJMJD5/JMJ30* (*Jumonji domain containing 5/JumonjiC domain-containing protein 30*) aus *Arabidopsis thaliana* ortholog ist. Dieser TR ist im Verlauf des Trockenstress-Experiments in Scarlett stärker induziert als in Tadmor (Abbildung 4.10 A). Die Ct-Werte bestätigen weiterhin den unterschiedlichen Transkriptgehalt unter Kontrollbedingungen.

Gene der Familien bHLH, NAC, AP2/EREBP, Jumonji, sowie ein unbekanntes Gen haben unter Kontrollbedingungen in Tadmor ein geringeres Transkriptlevel als in Scarlett (Tabelle 4.5 unten). Den niedrigsten Wert erreicht das unbekannte Gen (AK362981). Im Verlauf des Trockenstress-Experiments ist dieses Gen in Tadmor stärker induziert. Das relative Transkriptlevel erreicht zum Zeitpunkt T3 in beiden Kultivaren einen ähnlichen Wert. Dieses Regulationsmuster wird mittels qRT-PCR bestätigt (Abbildung 4.10 B).

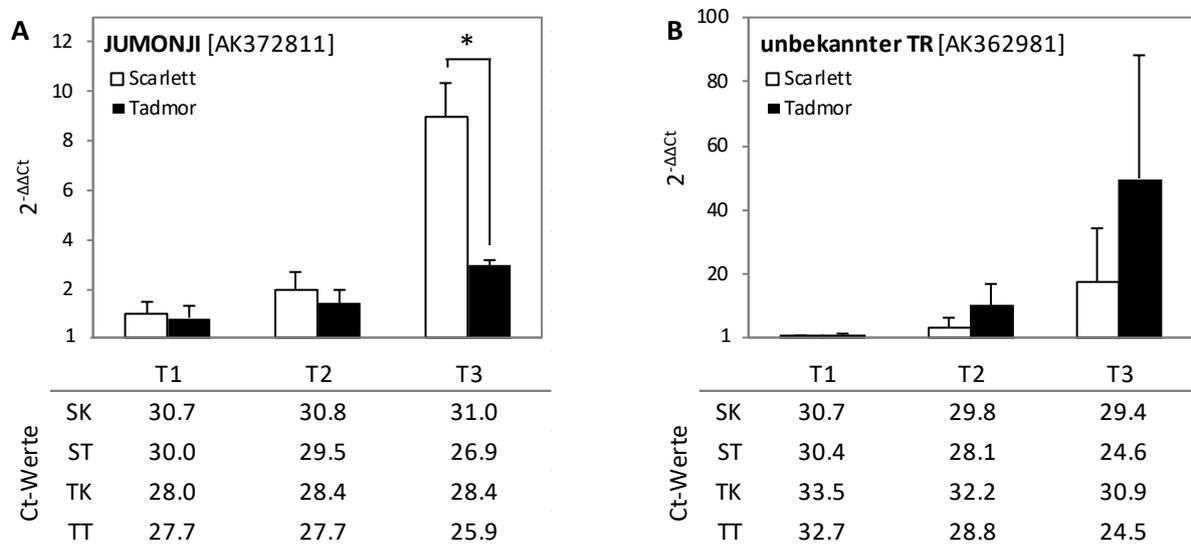


Abbildung 4.10 Relatives Expressionslevel ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) der Kandidaten-Gene A) *Jumonji* (AK372811) und B) *unbekannter TR* (AK362981) unter Trockenstress in Scarlett und Tadmor. Die relativen Expressionslevel wurden mittels qRT-PCR für die drei Trockenstress-Stadien (T1, T2, T3) ermittelt und beziehen sich auf die jeweilige unbehandelte Kontrolle (K1, K2, K3), welche im Wert gleich 1 gesetzt wurde. Die jeweiligen gemittelten Ct-Werte sind unter dem Diagramm dargestellt. Die Normalisierung aller Werte erfolgte auf das Referenzgen *HvActin*. Die Mittelwerte mit den zugehörigen Standardabweichungen beruhen auf den Daten von drei biologischen Replikaten. SK-Scarlett Kontrolle, ST-Scarlett Trockenstress, TK-Tadmor Kontrolle, TT-Tadmor Trockenstress * kennzeichnet signifikante Unterschiede zwischen Scarlett und Tadmor; zweiseitiger Student t-Test $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**), $p \leq 0,001$ (***)).

Cluster 2 und Cluster 3

In Cluster 2 befinden sich 62 TR, die im Trockenstress-Verlauf in Scarlett induziert und in Tadmor nicht reguliert vorliegen. Das Ranking ergab fünf Kandidaten-Gene der Familien bZIP, bHLH, C2C2(Zn) CO-like, MYB und HB (Tabelle 4.6 oben).

Tabelle 4.6 Kandidaten-Gene (TR) Cluster 2 (n=62) und Cluster 3 (n=15)

	Nr.	TargetID ^a	Genfamilie ^b	Hv Acc. No. ^c	TAIR10 ^d	Scarlett				Tadmor				Scarlett
						K1	T1	T2	T3	K1	T1	T2	T3	T3-K1
Cluster 2	1	hv_04202*	bZIP	AK375694	HY5	-1.56	-1.01	-0.71	3.56	0.37	0.29	-0.12	1.37	5.12
	2	hv_05705	bHLH	AK374787	SPT	-1.39	-0.05	0.36	2.63	0.29	0.14	-0.18	-0.38	4.02
	3	hv_39820	C2C2(Zn) CO-like	AK372561	BBX13	-2.63	-2.80	-3.13	0.54	2.72	1.74	1.74	1.98	3.18
	4	hv_22981	MYB	AK354439	MYB55	-1.60	-0.66	-0.03	1.43	0.11	-0.19	0.18	0.29	3.03
	5	hv_20950	HB	AK368549	HB4	-0.87	0.09	2.40	2.13	1.09	1.41	1.82	1.62	3.00
Cluster 3														Tadmor
														T3-K1
	1	hv_24944	General Transcription	AK365188	GRF4	0.20	-0.56	-1.16	-0.54	2.02	2.49	3.38	4.02	2.00
	2	hv_17201*	GRAS	AK357996	SCL14	0.32	0.19	0.02	0.05	-1.12	-0.48	-0.03	0.70	1.82
	3	hv_05913	MYB-related	AK375507	ACC1	-0.53	0.27	0.40	0.28	0.17	0.33	1.05	1.72	1.55
4	hv_15057	unbekannt	AK355480	-	-0.48	0.14	-0.17	-0.53	-0.05	0.63	0.64	1.41	1.46	
5	hv_06548	bZIP	AK372715	BZIP53	-0.42	0.43	0.20	0.50	0.71	1.23	1.25	2.13	1.42	

Relatives Expressionslevel (log₂FC-Wert) von Kandidaten-Gene (TR) im Verlauf des Trockenstress-Experiments (K1, T1, T2, T3) in Scarlett und Tadmor. TR nur in Scarlett induziert (oben), TR nur in Tadmor induziert. ^aProbe auf dem Agilent 60K-Microarray, ^bGenfamilie (MAPMAN), ^cGenBank accession no. *Hordeum vulgare*, ^dGen-Annotation *Arabidopsis thaliana* (TAIR10) *markierte Gene für detaillierte Expressionsanalysen (qRT-PCR).

Der TR der Familie bZIP (AK375694) ist in *Arabidopsis thaliana* als *AtHY5* beschrieben. Dieser ist in Scarlett am stärksten reguliert und wird für die weitere Analyse ausgewählt. Expressionsstudien bestätigen die Trockenstress-abhängige Induktion für AK375694 (Abbildung 4.11 A).

Das Cluster mit der geringsten Anzahl an TR ist Cluster 3. Insgesamt wurden 15 TR ermittelt, die nur in Tadmor im Verlauf des Trockenstress-Experiments induziert sind. Die fünf am stärksten regulierten TR sind in Tabelle 4.6 (unten) dargestellt. Für den am stärksten regulierten *General Transcription*-TR ergaben die Expressionsanalysen mittels qRT-PCR keine eindeutigen Ergebnisse. Der putative GRAS-TR (AK357996) ist in *Arabidopsis thaliana* als orthologes Gen *AtSCL14* (*Scarecrow-like 14*) bekannt. Die schwache Induktion dieses TRs konnte nicht bestätigt werden. Genaue Expressionsanalysen zeigen, dass dieser TR im Verlauf des Experiments auch unter Kontrollbedingungen induziert ist (Abbildung 4.11 B).

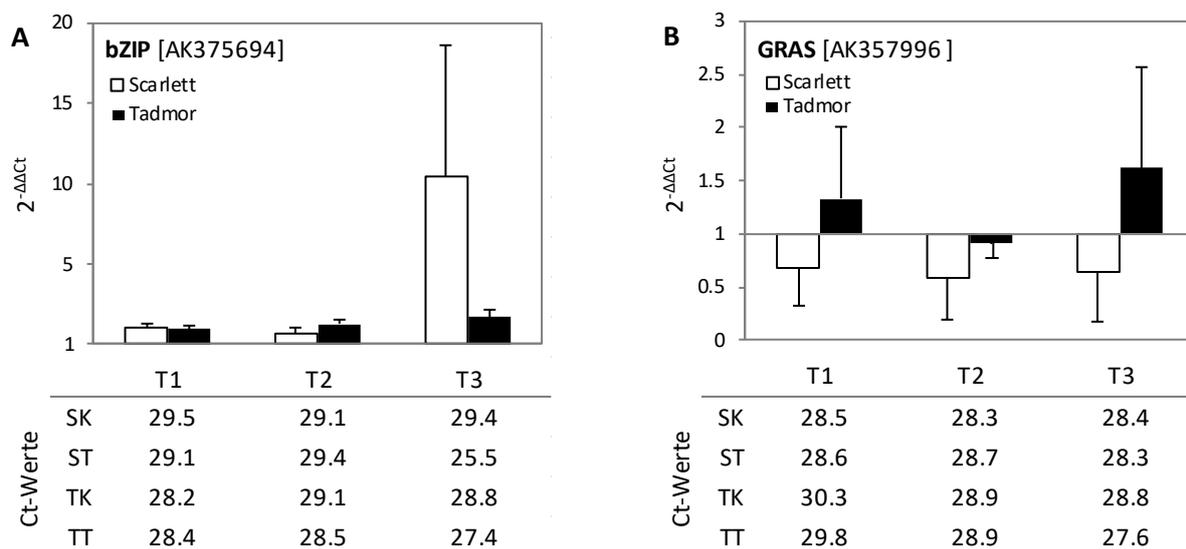


Abbildung 4.11 Relatives Expressionslevel ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) der Kandidaten-Gene A) *bZIP* (AK375694) und B) *GRAS* (AK357996) unter Trockenstress in Scarlett und Tadmor. Die relativen Expressionslevel wurden mittels qRT-PCR für die drei Trockenstress-Stadien (T1, T2, T3) ermittelt und beziehen sich auf die jeweilige unbehandelte Kontrolle (K1, K2, K3), welche im Wert gleich 1 gesetzt wurde. Die jeweiligen gemittelten Ct-Werte sind unter dem Diagramm dargestellt. Die Normalisierung aller Werte erfolgte auf das Referenzgen *HvActin*. Die Mittelwerte mit den zugehörigen Standardabweichungen beruhen auf den Daten von drei biologischen Replikaten. SK-Scarlett Kontrolle, ST-Scarlett Trockenstress, TK-Tadmor Kontrolle, TT-Tadmor Trockenstress

Cluster 4

Die größte Anzahl an TR enthält Cluster 4. Insgesamt sind 422 TR in Scarlett und Tadmor im Trockenstress-Verlauf reprimiert. Wie bereits in Cluster 1 beschrieben, ergeben sich auch in diesem Cluster Unterschiede zwischen beiden Kultivaren hinsichtlich der relativen Transkriptmenge unter Kontrollbedingungen.

Im Vergleich zu Scarlett haben fünf Kandidaten-Gene der Familien NAC, AP2/EREBP, MYB-related, MADS und einer unbekanntem Familie in Tadmor zu Beginn des Trockenstress-Experiments einen höheren Transkriptgehalt (Tabelle 4.7 oben). Ein Mitglied der AP2/EREBP-Genfamilie (DQ445244) ist das in *Arabidopsis thaliana* orthologe Gen *CBF4* (*C-REPEAT-BINDING FACTOR 4*). Der unterschiedliche Transkriptgehalt zwischen Scarlett und Tadmor wird bestätigt (Abbildung 4.12 A). Jedoch sind die ermittelten Transkriptmengen in beiden Kultivaren so gering (Ct-Werte ≥ 30), dass eine trockenstress-bedingte Repression mittels qRT-PCR nicht detektiert werden kann. Fünf weitere Kandidaten-Gene der MYB, MYB-related und einer unbekanntem Genfamilie sind unter Kontrollbedingungen in Tadmor stärker reprimiert als in Scarlett (Tabelle 4.7 unten).

Tabelle 4.7 Kandidaten-Gene (TR) für Cluster 4 (n=422)

	Nr.	TargetID ^a	Genfamilie ^b	Hv Acc. No. ^c	TAIR10 ^d	Scarlett				Tadmor				T vs.S
						K1	T1	T2	T3	K1	T1	T2	T3	K1-K1
Cluster 4	1	hv_14461	NAC	AK249102	NAC081	0.65	-0.98	-1.42	-1.41	5.55	5.00	3.66	3.06	4.90
	2	hv_16574	unbekannt	AK358784	-	0.29	-0.99	-3.64	-4.57	5.07	4.88	2.45	-1.21	4.77
	3	hv_08918*	AP2/EREBP	DQ445244	CBF4	-0.56	-0.48	-1.06	-3.42	3.07	2.93	2.95	1.71	3.63
	4	hv_01994	MYB-related	AK361203	RL6	0.45	0.16	-1.33	-1.64	3.67	2.26	-0.90	-1.06	3.22
	5	hv_00167	MADS	HM130525	AGL19	0.23	0.37	-1.10	-3.75	2.52	1.67	1.64	1.14	2.29
	1	hv_09968*	unbekannt	AK369809	-	1.65	1.75	0.89	-1.99	-4.50	-5.19	-6.42	-7.02	-6.15
	2	hv_01996	MYB-related	AK361203	RL1	2.85	-0.15	-2.13	-2.52	0.85	-1.20	-1.83	-2.38	-1.99
	3	hv_04697	MYB	AK365447	MYB93	2.30	1.71	-1.27	-1.37	0.31	-0.41	0.10	-1.45	-1.98
	4	hv_14466	unbekannt	AK359050	-	1.20	0.98	0.16	0.07	-0.63	-0.66	-1.13	-1.89	-1.83
	5	hv_14465	unbekannt	AK355570	-	0.75	0.56	-0.19	-0.29	-0.99	-1.18	-1.87	-2.60	-1.74

Relatives Expressionslevel (log₂FC-Wert) von Kandidaten-Gene (TR) im Verlauf des Trockenstress-Experiments (K1, T1, T2, T3) in Scarlett und Tadmor. log₂FC-Wert zum Zeitpunkt K1 höher in Tadmor (oben), höher in Scarlett (unten). ^aProbe auf dem Agilent 60K-Microarray, ^bGenfamilie (MAPMAN), ^cGenBank accession no. *Hordeum vulgare*, ^dGen-Annotation *Arabidopsis thaliana* (TAIR10) *markierte Gene für detaillierte Expressionsanalysen (qRT-PCR).

Der größte Unterschied im Transkriptgehalt zwischen Scarlett und Tadmor wird für einen unbekanntes TR (AK369809) bestimmt. Expressionsanalysen bestätigen die Repression unter Trockenstressbedingungen in beiden Kultivaren (Abbildung 4.12 B). Die ermittelten Ct-Werte belegen weiterhin, dass das Transkriptlevel zu Beginn des Trockenstress-Experiments (K1) in Tadmor bereits deutlich geringer ist, als in Scarlett.

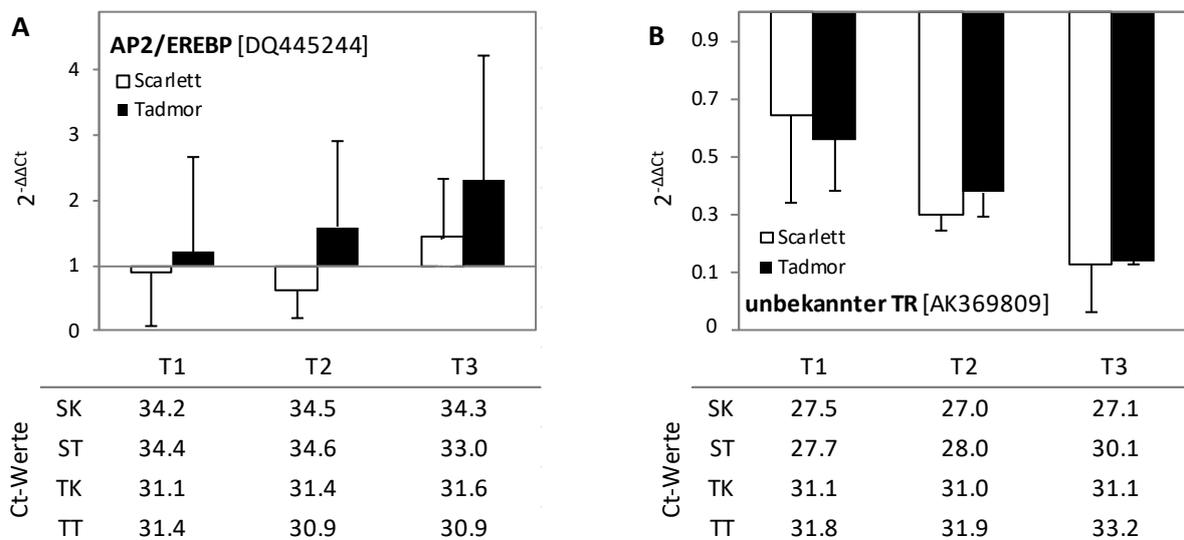


Abbildung 4.12 Relatives Expressionslevel ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) der Kandidaten-Gene A) *AP2/EREBP* (DQ445244) und B) *unbekanntes TR* (AK369809) unter Trockenstress in Scarlett und Tadmor. Die relativen Expressionslevel wurden mittels qRT-PCR für die drei Trockenstress-Stadien (T1, T2, T3) ermittelt und beziehen sich auf die jeweilige unbehandelte Kontrolle (K1, K2, K3), welche im Wert gleich 1 gesetzt wurde. Die jeweiligen gemittelten Ct-Werte sind unter dem Diagramm dargestellt. Die Normalisierung aller Werte erfolgte auf das Referenzgen *HvActin*. Die Mittelwerte mit den zugehörigen Standardabweichungen beruhen auf den Daten von drei biologischen Replikaten. SK-Scarlett Kontrolle, ST-Scarlett Trockenstress, TK-Tadmor Kontrolle, TT-Tadmor Trockenstress

Cluster 5 und Cluster 6

Cluster 5 enthält 47 TR, die im Trockenstress-Verlauf in Scarlett reprimiert und in Tadmor nicht reguliert sind. Zu den Kandidaten-Genen zählen TR der Familien MYB-related, C2H2, SET, und einer unbekannt Familie (Tabelle 4.8 oben). Ein MYB-related-TR (AK376021) ist im Verlauf des Trockenstress-Experiments am stärksten in Scarlett reprimiert (Abbildung 4.13 A). Dieser TR ist ortholog zum Gen *AtRL5 (RAD-like 5)* in *Arabidopsis thaliana*. BAXTER *et al.*, 2007 fanden heraus, dass einige Mitglieder der RL (*RAD-like*)-Genfamilie in der Blütenentwicklung involviert sind. Die Ct-Werte belegen die starke Repression von T1 zu T3 in Scarlett, wohingegen dieser MYB-related-TR in Tadmor bereits zum Zeitpunkt T1 unter Kontroll- und Trockenstressbedingungen stark reprimiert vorliegt.

32 TR aus Cluster 6 sind im Verlauf des Trockenstress-Experiments nur in Tadmor reprimiert und in Scarlett nicht reguliert. Mitglieder der Genfamilien AP2/EREBP, GRAS, C2C2(Zn)GATA und bZIP sind als Kandidaten-Gene identifiziert (Tabelle 4.8 unten). Ein Mitglied der AP2/EREBP Genfamilie (AK362109) ist am stärksten in Tadmor reprimiert. Diese Regulation wurde mittels Expressionsanalysen bestätigt (Abbildung 4.13 B).

Tabelle 4.8 Kandidaten-Gene (TR) für Cluster 5 und Cluster 6

	Nr.	TargetID ^a	Genfamilie ^b	Hv Acc. No. ^c	TAIR10 ^d	Scarlett				Tadmor				Scarlett
						K1	T1	T2	T3	K1	T1	T2	T3	T3-K1
Cluster 5	1	hv_17807*	MYB-related	AK376021	RL5	4.64	3.48	-0.01	-3.22	-2.60	-2.43	-3.03	-2.10	-7.86
	2	hv_43595	C2H2	AK357775	-	0.14	0.14	-0.70	-3.08	0.78	0.81	0.71	-0.12	-3.21
	3	hv_42941	SET	AK375960	SUVH9	1.67	1.90	0.39	-1.18	-1.46	-1.10	-1.06	-1.26	-2.85
	4	hv_17619	unbekannt	AK252260	-	0.45	1.19	-2.51	-1.99	1.59	2.26	2.01	0.84	-2.44
	5	hv_43735	C2H2	AK359003	GIS2	0.36	-0.14	0.09	-2.07	0.66	0.44	0.56	-0.03	-2.43
														Tadmor
														T3-K1
Cluster 6	1	hv_28577*	AP2/EREBP	AK362109	-	-0.64	-0.15	0.07	0.32	-0.62	-1.85	-3.41	-3.95	-3.33
	2	hv_08468	AP2/EREBP	AK371941	RAV2	0.06	-0.68	-1.03	-0.88	1.36	-0.02	-0.61	-1.54	-2.90
	3	hv_44417	GRAS	AK364580	HAM3	0.35	0.18	-0.66	-0.57	0.80	0.68	-0.42	-1.54	-2.34
	4	hv_14474	C2C2(Zn) GATA	AK364126	GATA15	0.63	-0.13	-0.40	0.55	-0.08	-0.68	-1.26	-2.12	-2.03
	5	hv_36136	bZIP	AK370195	BZIP21	-0.31	0.45	0.19	0.39	-3.90	-4.62	-5.00	-5.70	-1.80

Relatives Expressionslevel (log₂FC-Wert) von Kandidaten-Gene (TR) im Verlauf des Trockenstress-Experiments (K1, T1, T2, T3) in Scarlett und Tadmor. TR nur in Scarlett reprimiert (oben), TR nur in Tadmor reprimiert. ^aProbe auf dem Agilent 60K-Microarray, ^bGenfamilie (MAPMAN), ^cGenBank accession no. *Hordeum vulgare*, ^dGen-Annotation *Arabidopsis thaliana* (TAIR10) *markierte Gene für detaillierte Expressionsanalysen (qRT-PCR).

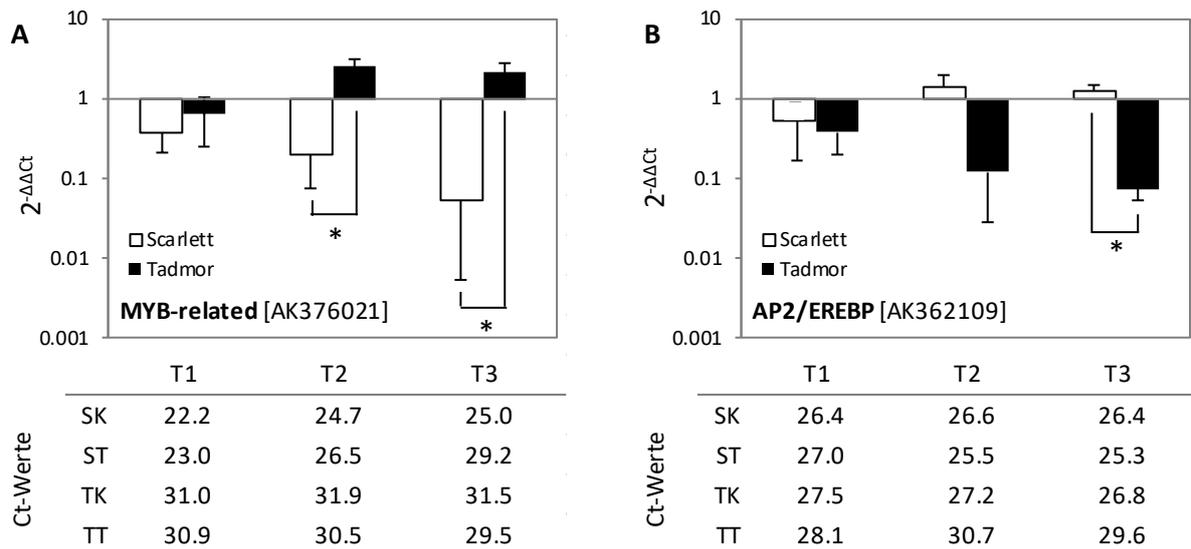


Abbildung 4.13 Relatives Expressionslevel ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) der Kandidaten-Gene *MYB-related* (AK376021) und *AP2/EREBP* (AK362109) unter Trockenstress in Scarlett und Tadmor. Die relativen Expressionslevel wurden mittels qRT-PCR für die drei Trockenstress-Stadien (T1, T2, T3) ermittelt und beziehen sich auf die jeweilige unbehandelte Kontrolle (K1, K2, K3), welche im Wert gleich 1 gesetzt wurde. Die jeweiligen gemittelten Ct-Werte sind unter dem Diagramm dargestellt. Die Normalisierung aller Werte erfolgte auf das Referenzgen *HvActin*. Die Mittelwerte mit den zugehörigen Standardabweichungen beruhen auf den Daten von drei biologischen Replikaten. SK-Scarlett Kontrolle, ST-Scarlett Trockenstress, TK-Tadmor Kontrolle, TT-Tadmor Trockenstress * kennzeichnet signifikante Unterschiede zwischen Scarlett und Tadmor; zweiseitiger Student t-Test $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**), $p \leq 0,001$ (***)

4.2.3.2 Polyamine (PA)

Polyamine sind in der Regulation der pflanzlichen Entwicklung und physiologischer Prozesse involviert (KUSANO *et al.*, 2008). Eine wichtige Funktion wird weiterhin in der biotischen und abiotischen Stressantwort diskutiert (HUSSAIN *et al.*, 2011).

Mit Hilfe der Microarray-Analysen werden 7 Gene des PA-Metabolismus identifiziert und ihr Expressionsmuster ermittelt (Tabelle 4.9). Spermin, Spermidin und Putrescin sind die Hauptvertreter der Polyamine. Fünf Gene, die für wichtige Enzyme der PA-Synthese codieren (Tabelle 4.9 oben), sind im Folgenden genauer dargestellt.

Der erste Schritt der PA-Synthese wird durch die Ornithin-Decarboxylase (ODC), oder über Agmatin durch die Arginin-Decarboxylase (ADC) katalysiert. Eine putative ADC (AK376935) ist zum Zeitpunkt T3 des Trockenstress-Experiments in Scarlett stärker induziert als in Tadmor. Diese Regulation wird mittels detaillierten Expressionsanalysen verifiziert (Abbildung 4.14 A).

Tabelle 4.9 Gene des Polyamin-Stoffwechsels (Synthese-oben, Degradation-unten).

Scarlett			Tadmor			T vs.S	K1	TargetID ^a	Genfamilie ^b	Hv Acc.No. ^c	Hv Anno ^c	TAIR10 ^d	At Acc.No. ^d
T1	T2	T3	T1	T2	T3								
							hv_43167	arginine decarboxylase	AK376935	unknown	ADC2	AT4G34710	Synthese
							hv_37178	SAM decarboxylase	AK365592	unknown	SAM DC	AT3G25570	
							hv_39521	SAM decarboxylase	AK252992	unknown	SAM DC	AT3G25570	
							hv_15626	spermidine synthase	AK376906	unknown	SAM MTases	AT5G04610	
							hv_39514	spermidine synthase	AK250159	unknown	SPDS2	AT1G70310	
							hv_19135	spermidine synthase	AK250159	unknown	SPDS2	AT1G70310	
							hv_01682	spermin synthase	AK362530	unknown	SPMS	AT5G53120	Degradation
							hv_01681	spermin synthase	AK362530	unknown	SPMS	AT5G53120	
							hv_03745	polyamin oxidase	AJ298131	PAO1	PAO1	AT5G13700	
							hv_08835	polyamin oxidase	AJ298132	PAO2	PAO1	AT5G13700	
							hv_03746	polyamin oxidase	AJ298132	PAO2	PAO1	AT5G13700	
							hv_03747	polyamin oxidase	AJ298132	PAO2	PAO1	AT5G13700	

log₂FC-4  log₂FC 4

Regulation (log₂FC-Wert), TargetID, *accession no.* und Annotation von Genen des Polyamin-Metabolismus im Verlauf des Trockenstressexperiments. Der Vergleich erfolgt zum Zeitpunkt T1, T2 und T3 mit der Kontrolle (K1) für Scarlett und Tadmor. Unter Kontrollbedingungen (K1) erfolgt der Vergleich zwischen Tadmor und Scarlett (T vs. S). Induzierte Gene sind rot, reprimierte Gene sind grün gekennzeichnet. ^aProbe auf dem Agilent 60K-Microarray, ^bGenfamilie (MAPMAN), ^cGenBank *accession no. Hordeum vulgare*, ^dGen-Annotation *Arabidopsis thaliana* (TAIR10) *unknown* = unbekanntes Protein/Funktion (NCBI/BLAST®).

Die Decarboxylierung von S-Adenosylmethionin ist die Voraussetzung für die Umwandlung von Putrescin in Spermidin. Diese Reaktion erfolgt durch die S-Adenosylmethionin Decarboxylase (SAMDC). Die trockenstress-abhängige Repression einer unbekanntes SAMDC (AK365592) wird nicht bestätigt. Die Expressionsanalysen ergeben, dass dieses Gen in Tadmor nicht reguliert ist und in Scarlett dagegen zum Zeitpunkt T3 leicht induziert ist (Abbildung 4.14 B). Die sehr hohen Ct-Werte (≥ 30) für AK365592 in beiden Kultivaren deuten auf eine sehr geringe Transkriptmenge hin. Aus diesem Grund sind belastbare Aussagen über deren Genregulationen nicht möglich. Eine weitere SAMDC (AK252992) ist unter Trockenstressbedingungen in beiden Kultivaren nicht reguliert (Abbildung 4.14 C). Im weiteren Verlauf der PA-Synthese wird Putrescin in Spermidin durch die Übertragung einer Aminopropylgruppe umgewandelt. Diese Reaktion erfolgt durch die Spermidin-Synthase (SPDS). Die Microarray-Analysen ergeben zwei regulierte putative SPDS. Unter Trockenstressbedingungen sind diese zwei SPDS in beiden Kultivaren leicht reprimiert. Entgegen den Microarray-Daten ergeben die genauen Analysen, dass beide SPDS (AK376906) und (AK250159) nicht reguliert sind (Abbildung 4.14 D und E).

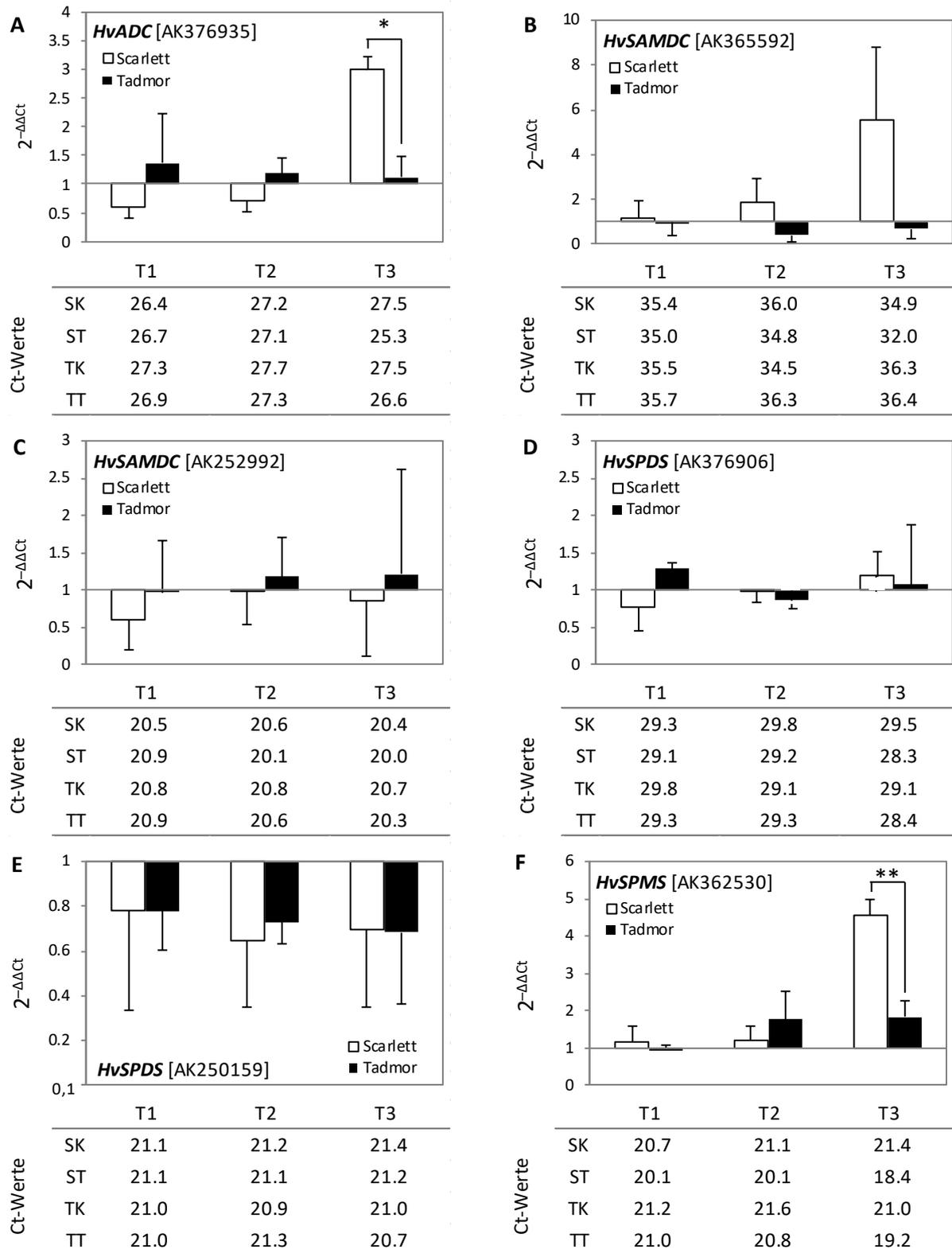


Abbildung 4.14 Relatives Expressionslevel ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) der Polyamin-Stoffwechsel Gene *HvADC* [AK376935] (A), *HvSAMDC* [AK365592] (B), *HvSAMDC* [AK252992] (C), *HvSPDS* [AK376906] (D) *HvSPDS* [AK250159] (E) und *HvSPMS* [AK362530] (F) in Scarlett und Tadmor. Die relativen Expressionslevel wurden mittels qRT-PCR für die drei Trockenstress-Stadien (T1, T2, T3) ermittelt und beziehen sich auf die jeweilige unbehandelte Kontrolle (K1, K2, K3), welche im Wert gleich 1 gesetzt wurde. Die jeweiligen gemittelten Ct-Werte sind unter dem Diagramm dargestellt. Die Normalisierung aller Werte erfolgte auf das Referenzgen *HvActin*. Die Mittelwerte mit den zugehörigen Standardabweichungen beruhen auf den Daten von drei biologischen Replikaten. SK-Scarlett Kontrolle, ST-Scarlett Trockenstress, TK-Tadmor Kontrolle, TT-Tadmor Trockenstress * kennzeichnet signifikante Unterschiede zwischen Scarlett und Tadmor; zweiseitiger Student t-Test $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**), $p \leq 0,001$ (***)

Im letzten Schritt der PA-Synthese wird durch die Übertragung einer weiteren Aminopropylgruppe Spermidin zu Spermin gebildet. Diese Reaktion wird durch die Spermin-Synthase (SPMS) ausgeführt. Die SPMS (AK362530) ist zum Zeitpunkt T3 in Scarlett stärker induziert als in Tadmor, wie Abbildung 4.14 F belegt.

Beim Abbau der PA wird Spermin über die Zwischenform Spermidin in Putrescin umgewandelt. Zwei identifizierte Gene codieren für Enzyme, welche diese Reaktion katalysieren. Die Polyamin-Oxidasen (PAO) werden im Folgenden genauer analysiert (Tabelle 4.9 unten).

Die Microarray-Daten zeigen, dass *HvPAO1* (AJ298131) unter Trockenstress in beiden Kultivaren gleich stark reprimiert ist. *HvPAO2* (AJ298132) ist dagegen zum Zeitpunkt T2 und T3 in Tadmor induziert. Die detaillierte Analyse mittels qRT-PCR zeigt ein differenziertes Bild (Abbildung 4.15 A und B). *HvPAO1* und *HvPAO2* sind im Verlauf des Trockenstress-Experiments in beiden Kultivaren leicht induziert, allerdings in Tadmor deutlich mehr als in Scarlett. Interessanterweise werden dagegen beide Gene unter Kontrollbedingungen in Scarlett und Tadmor reprimiert.

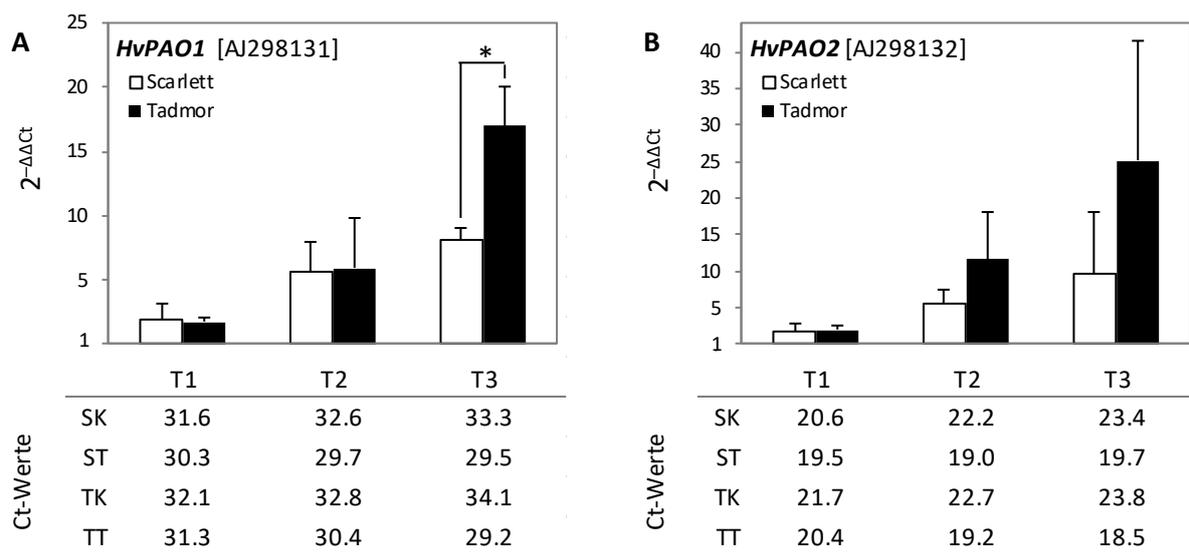


Abbildung 4.15 Relatives Expressionslevel ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) der Polyamin-Stoffwechsel Gene *HvPAO1* [AJ298131] (A) und *HvPAO2* [AJ298132] (B) in Scarlett und Tadmor. Die relativen Expressionslevel wurden mittels qRT-PCR für die drei Trockenstress-Stadien (T1, T2, T3) ermittelt und beziehen sich auf die jeweilige unbehandelte Kontrolle (K1, K2, K3), welche im Wert gleich 1 gesetzt wurde. Die jeweiligen gemittelten Ct-Werte sind unter dem Diagramm dargestellt. Die Normalisierung aller Werte erfolgte auf das Referenzgen *HvActin*. Die Mittelwerte mit den zugehörigen Standardabweichungen beruhen auf den Daten von drei biologischen Replikaten. SK-Scarlett Kontrolle, ST-Scarlett Trockenstress, TK-Tadmor Kontrolle, TT-Tadmor Trockenstress. * kennzeichnet signifikante Unterschiede zwischen Scarlett und Tadmor; zweiseitiger Student t-Test $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**), $p \leq 0,001$ (***)

4.2.4 Validierung der Microarray Daten

Die Korrelation zwischen den Microarray und den qRT-PCR-Daten wird für alle 15 ausgewählten Kandidaten-Gene überprüft. Hierfür werden die relativen Expressionslevel ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) der qRT-PCR-Analysen gegen die \log_2FC -Werte (Trockenstress/Kontrolle) der Microarray-Analysen aufgetragen (Abbildung 4.16).

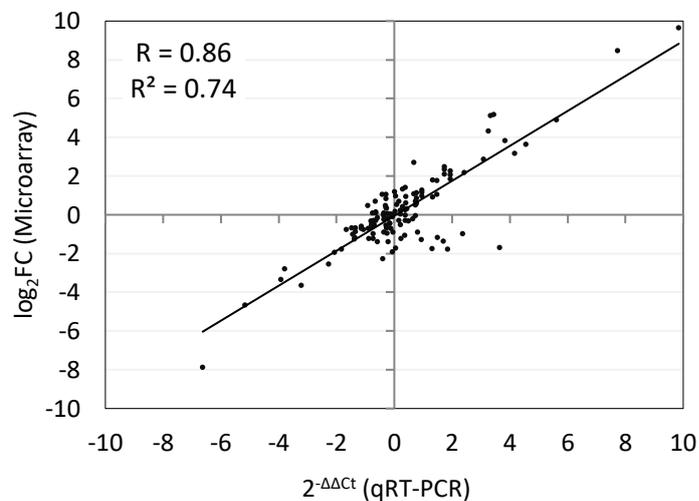


Abbildung 4.16 Korrelation zwischen Microarray- und qRT-PCR-Daten. Die Berechnung beruht auf der Analyse aller 15 beschriebenen Kandidaten-Gene. Die relativen Expressionslevel ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) der qRT-PCR-Analysen sind gegen die \log_2FC -Werte der Microarray-Analysen aufgetragen (Trockenstress vs. Kontrolle). R = Pearson-Korrelationskoeffizient, R^2 = Bestimmtheitsmaß

Bei der Auswertung der Microarray-Daten werden alle Trockenstress-Stadien auf das Kontroll-Stadium K1 bezogen. Für die Vergleichbarkeit beziehen sich aus diesem Grund die relativen Expressionslevel ebenfalls auf die Kontrolle K1. Für die Mehrheit der untersuchten Kandidaten-Gene besteht eine hohe Korrelation ($R=0,86$).

V Diskussion

Die Trockentoleranz ist eine sehr komplexe Eigenschaft vieler Pflanzen und basiert auf einer Vielzahl physiologischer und biochemischer Reaktionen (CATTIVELLI *et al.*, 2008). Die Tatsache, dass Trockenstress als einer der einflussreichsten Umweltfaktoren dramatische Folgen für die weltweite Getreideproduktion hat, rückt die Forschung um das Thema der pflanzlichen Stressantwort in einen besonders brisanten Fokus. Im Mittelpunkt steht die Identifizierung jener Gene, welche mit der Ausbildung der Trockentoleranz assoziiert sind und zur Sicherung des Ernteertrags unter Wasserknappheit beitragen können (TESTER & LANGRIDGE, 2010). Ein besonderes Potential liefern dabei Landrassen, welche an die natürlichen Bedingungen ihrer Region angepasst sind (SALAMINI *et al.*, 2002). In der vorliegenden Arbeit wurde die trockenolerante syrische Landrasse Tadmor mit Scarlett, einer trockenoleranten Kulturform von *Hordeum vulgare* unter dem Einfluss von Trockenstress auf physiologischer und molekularer Ebene analysiert. Tadmor entstammt der syrischen Landrasse Arabi Aswad, welche in den vermutlich trockensten Teilen Syriens vorkommt (WELTZIEN, 1988). Die Fähigkeit von Tadmor in semiariden Gebieten zu überleben basiert auf einer hohen osmotischen Anpassungsfähigkeit (TEULAT *et al.*, 1997) und einer effizienten Wassernutzung (TEULAT *et al.*, 2001). Weiterhin ist Tadmor durch eine hohe Ertragsstabilität charakterisiert (GRANDO, 1989). Dieser positive Zusammenhang zwischen hohem Ertrag und osmotischer Anpassungsfähigkeit unter Trockenstressbedingungen wurde neben Gerste auch für Weizen (*Triticum aestivum* und *T. durum*), Mais (*Zea mays*) und Hirse (*Sorghum bicolor*) beschrieben (zitiert in BLUM, 2016).

5.1. Trockenstress-System

Aus der Literatur sind zahlreiche Trockenstress-Studien mit *Hordeum vulgare* bekannt. Oftmals wurde die Reaktion auf Trockenstress an einem einzigen Genotyp analysiert (z.B. OZTURK *et al.*, 2002, ATIENZA *et al.*, 2004; TALAME *et al.*, 2007, TOMMASINI *et al.*, 2008, SEILER *et al.*, 2011). In der vorliegenden Arbeit wurde dagegen die Trockenstress-Antwort einer sensitiven Sorte mit der einer trockenoleranten Sorte verglichen, was die Identifizierung von Schlüssel-Genen der Trockentoleranz ermöglicht (siehe auch SUPRUNOVA *et al.*, 2004; LI *et al.*, 2006; GUO *et al.*, 2009; SVOBODA *et al.*, 2016).

Weiterhin müssen die optimalen Anzuchtbedingungen und das Verfahren, wie der Trockenstress induziert wird, berücksichtigt werden. Beim experimentellen Ansatz von OZTURK *et al.*, 2002 und ATIENZA *et al.*, 2004 erfolgte die Anzucht der Gerste in Sand als Substrat und als Hydrokultur. Der Trockenstress wurde abrupt gesetzt, indem die Pflanzen für sehr kurze Intervalle auf Filterpapier versetzt wurden. Charakteristisch für Feldbedingungen und damit vergleichbarer sind Experimente mit Erde als Substrat und längeren Trockenperioden (TOMMASINI *et al.*, 2008; KORFF *et al.*, 2008; SVOBODA *et al.*, 2016).

Nach diesen Bedingungen wurde das Trockenstress-System der AG HUMBECK etabliert und ermöglicht zeitgleiche Analyse mehrerer Genotypen von *Hordeum vulgare* unter Trockenstress.

Auch das Entwicklungsstadium, in welchem der Trockenstress appliziert werden soll, muss für das Testsystem berücksichtigt werden, da sich einzelne Kultivare z.B. hinsichtlich der Bedingungen und des Zeitpunktes der Blüte stark unterscheiden. Im Gegensatz zu Scarlett, einer zweizeiligen Sommergerste, benötigt Tadmor für die Blütenbildung eine Vernalisation (FORSTER *et al.*, 2004). Eine Untersuchung der terminalen Trockenstress-Antwort anhand der Fahnenblätter ist dadurch nicht möglich. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit die frühe Trockenstress-Antwort an den Primärblättern von *Hordeum vulgare* analysiert, was einen optimalen Vergleich der beiden Kultivare Scarlett und Tadmor ermöglicht.

5.2 Die trockenstress-induzierte Blattseneszenz in Scarlett und Tadmor

5.2.1 Physiologische Veränderungen in Scarlett und Tadmor unter Trockenstressbedingungen

Trockenstress induziert Seneszenz-Prozesse. Die Blattvergilbung, als sichtbares Indiz, ist die Folge des Chlorophyll-Abbaus. Weiterhin sinkt die Photosynthese-Aktivität durch oxidative Schädigung der Elektronentransportkette und der Photosysteme (MUNNÉ - BOSCH & ALEGRE *et al.*, 2004; BUCHANAN-WOLLASTON *et al.*, 2003; LIM *et al.*, 2007). Stabile Werte des Chlorophyllgehaltes und der Chlorophyllfluoreszenz sind daher zuverlässige Indikatoren für die Anpasstheit an Trockenstressbedingungen und dienen zur Überprüfung der Trockentoleranz (LI *et al.*, 2006). Eine stark verzögerte trockenstress-induzierte Blattseneszenz konnte auf diese Weise für Tadmor bestätigt werden. Im Vergleich zu Scarlett sinken beide Parameter zu einem späteren Zeitpunkt des Trockenstress-Experiments. Weiterhin konnte die Trockentoleranz von Tadmor in verschiedenen Entwicklungsstadien

festgestellt werden. So finden Blattseneszenz-Prozesse verzögert statt, wenn der Trockenstress sehr frühzeitig im Zwei-Blatt-Stadium induziert wird (VOLAIRE, 2003), aber auch unter terminalen Stressbedingungen, mit Beginn des Blüte-Stadiums (Li *et al.*, 2006).

Die Fähigkeit von Tadmor, mit Wasserknappheit umgehen zu können ist gut untersucht. Dazu gehören eine erhöhte Widerstandskraft gegenüber oxidativen Stress durch Starklicht, eine hohe osmotische Anpassungsfähigkeit, ein verringerter Chlorophyllgehalt der Blätter, eine optimale Wassernutzungs-Effizienz, eine geringe Transpirationsrate und stomatäre Leitfähigkeit (HAVAUX & TARDY, 1999; TARDY *et al.*, 1998; TEULAT *et al.*, 1997; TEULAT, 2001; MIKULKOVÁ *et al.*, 2009). Diese Eigenschaften verleihen Tadmor eine sehr gute Anpasstheit an trocken-heiße und sonnige Standortbedingungen der syrischen Steppe.

Im Vergleich zu Scarlett ist der relative Chlorophyllgehalt in Tadmor um etwa 24% reduziert, wodurch die Blätter unter Kontrollbedingungen eine blassgrüne Färbung besitzen. TARDY *et al.*, 1998 bestätigen, dass der Pigmentgehalt in Tadmor gegenüber dem trocken-sensitiven Kultivar Plaisant um 30% verringert ist. Die dadurch reduzierte Lichtabsorption in den Blättern schützt die Photosysteme passiv vor Hitzeschäden und Photoinhibition durch Starklicht. Weiterhin vermuten diese Autoren einen aktiven Schutz des photochemischen Apparates durch einen schnellen Xanthophyll-Zyklus (TARDY *et al.*, 1998).

5.2.2 Expression der Marker-Gene *HvA1*, *HvS40*, *HvDhn1* und *HvHsp17* in Scarlett und Tadmor unter Trockenstressbedingungen

Die gegenüber Scarlett verzögerte trockenstress-induzierte Seneszenz bei Tadmor spiegelt sich auf molekularer Ebene in Unterschieden bei der Expression von Seneszenz und Stress-Genen wider. In Scarlett bewirkt Trockenstress die verstärkte Induktion von Genen für die Degradation von Lipiden, Aminosäuren und Nukleotiden. Unter anderem sind diese Gengruppen ebenfalls als SAGs während der natürlichen Blattseneszenz induziert (GUO *et al.*, 2004; BUCHANAN-WOLLASTON *et al.*, 2003; LIM *et al.*, 2007). Die zwei Marker-Gene *HvA1* und *HvS40* sind in Scarlett und Tadmor unter Trockenstress unterschiedlich reguliert und bestätigen die verzögerte trockenstress-induzierte Blattseneszenz von Tadmor im Vergleich zu Scarlett auf molekularer Ebene. *HvA1* codiert für ein LEA-Protein der Gruppe 3, welches unter Trockenstressbedingungen induziert ist (XU *et al.*, 1996, HONG *et al.*, 1992). Die Überexpression von *HVA1* führt zu einer verbesserten Trockentoleranz. Dies bestätigen transgene Studien in Reis (XIAO *et al.*, 2007; ROHILA *et al.*, 2002; CHANDRA BABU *et al.*, 2004),

Weizen (SIVAMANI *et al.*, 2000), Hafer (MAQBOOL *et al.*, 2002), Maulbeeren (LAL *et al.*, 2008), und im Weißen Straußgras (FU *et al.*, 2007). Diese Pflanzen zeigen eine erhöhte Stresstoleranz gegenüber Trockenheit und Salz durch die Aufrechterhaltung der Zellmembran-Stabilität und einen erhöhten relativen Wassergehalt. In Tadmor ist *HvA1* unter Trockenstress signifikant stärker induziert als in Scarlett, was eine erhöhte Trockentoleranz im Vergleich zu Scarlett widerspiegelt.

Trockenstress hat einen negativen Einfluss auf die Produktivität bzw. den Ernteertrag, da Prozesse der Blattseneszenz und der Fruchtreifung vorzeitig einsetzen (GREGERSEN *et al.*, 2013). *HvS40* codiert für einen putativen Regulator der Blattseneszenz und ist sowohl beim Eintritt in die natürliche Blattseneszenz als auch der Stress-abhängigen Seneszenz induziert. Dieses Gen dient somit als zuverlässiges Marker-Gen für Seneszenz (KRUPINSKA *et al.*, 2014). Dabei korreliert die Geninduktion von *HvS40* mit der Abnahme der Photosynthese-Effizienz (HUMBECK *et al.*, 1996). Zum Zeitpunkt T3 des Trockenstress-Experiments ist *HvS40* in Scarlett signifikant induziert. Gleichzeitig ist der relative Chlorophyllgehalt bereits um 50% reduziert und die Werte der PSII-Effizienz beginnen zu sinken. In Tadmor hingegen ist *HvS40* bis zu diesem Zeitpunkt nicht reguliert und die physiologischen Parameter zeigen keine Veränderungen zur Kontrolle (siehe Abbildung 4.2 und 4.4). Auch dieses Ergebnis bestätigt die verzögerte trockenstress-induzierte Blattseneszenz für Tadmor auf molekularer Ebene. AY *et al.*, 2015 belegen, dass *HvS40* im Verlauf der natürlichen Blattseneszenz epigenetisch reguliert wird. Dabei finden Veränderungen der Histon-Modifikation für *HvS40* auch unter Trockenstressbedingungen statt (JANACK & SOSOI, *et al.*, 2016). Diese Autoren dokumentieren, dass die trockenstress-induzierte Genexpression von *HvS40* ebenfalls epigenetisch gesteuert wird.

Dehydrine gehören zu den LEA-Proteinen (Gruppe 2) und sind unter Trockenstressbedingungen schnell und massiv induziert (KOSOVÁ *et al.*, 2014; TOMMASINI *et al.*, 2008). Dabei ist ein Mitglied *HvDhn1* in trockenoleranten Kultivaren von *Hordeum vulgare* stärker induziert als in trocken sensitiven Kultivaren. Dies belegen Trockenstress-Experimente mit Jungpflanzen und mit Pflanzen zum Zeitpunkt der Blüte (SUPRUNOVA *et al.*, 2004; KARAMI *et al.*, 2013). Diese Autoren vermuten einem Zusammenhang zwischen der zeitigen Geninduktion von *HvDhn1* und der Ausbildung der Trockentoleranz. In Scarlett und Tadmor ist *HvDhn1* bereits zum Zeitpunkt T2 stark induziert, allerdings ist das relative Expressionslevel in beiden Kultivaren unter Trockenstress ähnlich hoch. Dies lässt

vermuten, dass zum einem die transkriptionellen Unterschiede zwischen beiden Kultivaren noch zeitiger zwischen T1 und T2 stattfinden. Andererseits könnte *HvDhn1* zur Gruppe derjenigen DRGs gehören, welche in Scarlett und Tadmor unter Trockenstress gleich reguliert sind. SVOBODA *et al.*, 2016 fanden ebenfalls heraus, dass die meisten Dehydrin-codierenden Gene in Tadmor und einem trockensensitiven Kultivar (Amulet) unter Trockenstressbedingungen ähnlich stark induziert sind.

Auch ein Hitzeschockprotein (HSP) *HvHsp17* ist in beiden Kultivaren unter Trockenstress gleich stark induziert. Guo *et al.*, 2009 identifizierten *HvHsp17.9*, welches sowohl in einem trockensensitiven und trockentoleranten Kultivar von *Hordeum vulgare* durch Trockenstress induziert ist. Ein weiteres Mitglied dieser Genfamilie *HvHsp17.8* ist dagegen nur im trockentoleranten Kultivar induziert. Diese Autoren vermuten, dass die einzelnen HSPs verschiedene Funktionen in der Trockenstress-Antwort haben. Die Klasse der HSF (*heat-shock factors*)-TR binden an die konservierte Promotorregionen HSE (*heat-shock element*) der HSPs und regulieren auf diese Weise deren Genexpression (SCHÖFFL *et al.*, 1998). Die Microarray-Analysen zeigen, dass die Gruppe der HSFs in Scarlett und Tadmor im Verlauf des Trockenstress-Experiments signifikant induziert ist (Cluster 1). Dieses Ergebnis korreliert mit dem ähnlichen Expressionsmuster von *HvHsp17* in Scarlett und Tadmor.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass gemeinsame und unterschiedliche Signalwege in der molekularen Trockenstress-Antwort in beiden Kultivaren existieren, welche vermutlich die verstärkte Ausbildung der Trockentoleranz in Tadmor im Vergleich zu Scarlett realisieren.

5.3 Kandidaten-Gene der trockenstress-induzierten Blattseneszenz

5.3.1 Transkriptionsregulatoren

Zahlreiche Studien belegen, dass TR im Trockenstressgeschehen involviert sind. Einzelnen Mitgliedern der Genfamilien DREB/CBF, CCAAT, MYB, MYC, homeodomain, bHLH, NAC, AP2/ERF, bZIP, and WRKY wurde eine mögliche Potential zur Verbesserung der Trockentoleranz in Getreide zugeschrieben (RABARA *et al.*, 2014, TONDELLI *et al.*, 2006; HUSSAIN *et al.*, 2011). Nach vergleichenden Microarray-Analysen zur unterschiedlichen transkriptionellen Regulation der Trockenstress-Antwort bei Scarlett und Tadmor konnten differentiell regulierte Gene identifiziert werden. Mittels Clusteranalyse wurden daraufhin Kandidaten-Gene aus der Gruppe der TR ermittelt, die im Verlauf des Trockenstress-Experiments in Scarlett und Tadmor ähnlich und unterschiedlich reguliert sind. Ein aufgrund

ihres Expressionsverhaltens ausgewähltes Set an solchen Faktoren und ihre mögliche Funktion in der trockenstress-induzierten Blattseneszenz in *Hordeum vulgare* werden im Folgenden diskutiert.

5.3.1.1 Ein Jumonji-TR (*AtJMJD5/JMJ30*) ist in Scarlett und Tadmor unter Trockenstress induziert

Mitglieder der Jumonji-Genfamilie sind in beiden Kultivaren im Trockenstress-Verlauf signifikant induziert (Cluster 1). Jumonji-TR gehören zur Gruppe der pflanzlichen Demethylasen und haben damit eine wichtige Funktion in der epigenetischen Regulation der Genaktivität, aber auch in der pflanzlichen Entwicklung (CHEN, 2011; LUO *et al.*, 2014). PAPAETHIMIOU & TSAFTARIS, 2011 identifizierten in *Hordeum vulgare* eine putative Histon-3-Lysin-4-(H3K4) Demethylase (*HvPKDM7-1*), welche unter Trockenstress stark induziert ist. Diese Autoren vermuten weiterhin, dass dieser Faktor in der epigenetischen Regulation der Trockenstress-Antwort involviert ist.

Ein Vertreter der Jumonji-TR (AK372811) ist in Scarlett stärker induziert als in Tadmor. Das orthologe Gen in *Arabidopsis thaliana* *AtJMJD5/JMJ30* (At3g20810) ist in der circadian regulierten Genexpression beteiligt (JONES *et al.*, 2010; LU *et al.*, 2011). Der zentrale Feedback-Mechanismus der circadianen Rhythmik wird durch *TOC1* (*Timing of Cab1 Expression 1*), *CCA1* (*Circadian Clock Associated 1*) und *LHY* (*Late Elongated Hypocotyl*) realisiert. *TOC1* aktiviert die Genexpression von *CCA1* und *LHY*. *CCA1* und *LHY* binden wiederum an den Promotor von *TOC1* und unterdrücken dadurch die Expression von *TOC1* selbst. *AtJMJD5/JMJ30* besitzt ein ähnliches Expressionsmuster wie *TOC1*. Es aktiviert ebenfalls *CCA1* und *LHY* und wird durch *CCA1* reprimiert, sodass eine funktionelle Interaktion von *AtJMJD5/JMJ30* und *TOC1* vermutet werden kann (CHEN, 2011). Einen Zusammenhang zwischen der circadianen Rhythmik und Trockenstress zeigen LEGNAIOLI *et al.*, 2009. Diese Autoren vermuten, dass *TOC1* als molekularer Schalter in beiden Signalwegen involviert ist.

5.3.1.2 Ein bZIP-TR (*AtHY5*) ist nur in Scarlett unter Trockenstress induziert

Ein bZIP-TR (AK375694) ist dem Gen *AtHY5* (*Elongated Hypocotyl 5*) (AT5G11260) in *Arabidopsis thaliana* ortholog. Dieser TR ist im Verlauf des Trockenstress-Experiments in Scarlett induziert, in Tadmor jedoch nicht reguliert. Die große Gruppe der bZIP-TR umfasst in *Hordeum vulgare* 141 Proteine, codiert durch 89 Gene (POURABED *et al.*, 2014). Basierend auf ihrem DNA-Bindemotiv werden sie in 11 Gruppen eingeteilt. Die Gruppe H besteht aus 3

HvbZIP-Genen und ist namentlich dem *AtHY5* aus *Arabidopsis thaliana* zugeschrieben (POURABED *et al.*, 2014). *HY5* ist ein positiver Regulator der Photomorphogenese und der pflanzlichen Entwicklung (ANG *et al.*, 1998). Er ist in der Photorezeptor-vermittelten Licht-Signalwirkung und der Anthocyan-Biosynthese involviert (ANG *et al.*, 1998; SHIN *et al.*, 2013; GYULA *et al.*, 2003). Anthocyane gehören zu den Flavonoiden, einer Gruppe pflanzlicher Sekundärstoffe mit antioxidativer Wirkung. Pflanzen akkumulieren diese Substanzen unter abiotischen und biotischen Stressbedingungen und in der natürlichen Blattseneszenz (CHALKER-SCOTT, 1999; DIXON & PAIVA, 1995; HATIER & GOULD, 2008; NAKABAYASHI *et al.*, 2014). Dies lässt vermuten, dass *HY5* unter Trockenstress in Tadmor stärker induziert ist als in Scarlett. Doch die Expressionsanalysen zeigen ein gegenteiliges Ergebnis. Interessanterweise belegen AY *et al.*, 2014, dass eine Vielzahl von Seneszenz-assoziierten Genen potentielle Ziel-Gene von *AtHY5* sind. Die Induktion von *HY5* und des Seneszenz-Marker-Gens *HvS40* in Scarlett lassen demnach vermuten, dass dieser bZIP-TR nicht nur in der Anthocyan-Biosynthese involviert ist, sondern in Gerste auch trockenstress-induzierte Seneszenz-Prozesse auslöst. In Übereinstimmung mit dieser Vermutung, sind beide Gene (*HY5* und *HvS40*) in Tadmor bis zum Zeitpunkt T3 nicht reguliert. Unterstützt wird diese Hypothese durch vergleichende Trockenstress-Experimente von SVOBODA *et al.*, 2016. Diese Autoren fanden heraus, dass *HY5* in Amulet, einem trockensensitiven Kultivar von *Hordeum vulgare*, stärker induziert ist als in Tadmor. In weiterführenden Experimenten können Expressionsdaten von *HY5* zu späteren Zeitpunkten des Trockenstress-Experiments und von *HY5*-Ziel-Genen in Scarlett und Tadmor wichtige Informationen zur Funktion dieses TR liefern.

5.3.1.3 Ein GRAS-TR (*AtSCL14*) ist nur in Tadmor unter Trockenstress induziert

GRAS-TR kommen nur in Pflanzen vor und spielen eine wichtige Rolle bei Wachstums- und Entwicklungsvorgängen, insbesondere bei der Gibberellin-Signaltransduktion. Sie sind aber auch in der biotischen und abiotischen Stressantwort involviert (TIAN *et al.*, 2004; XU *et al.*, 2015; BOLLE, 2004). Der Name beruht auf den drei anfänglich entdeckten Mitgliedern *Gibberellin-acid insensitive* (GAI), *Repressor of GA1* (RGA) und *Scarecrow* (SCR) (PYSH *et al.*, 1999). Die GRAS Genfamilie setzt sich aus mehreren Untergruppen zusammen. Die Untergruppe der LISCL enthält das in *Arabidopsis thaliana* bekannte Gen *AtSCL14* (AT1G07530) (XU *et al.*, 2015). Dieser TR ist dem identifizierten GRAS-TR ortholog, welcher nur in Tadmor unter Trockenstress leicht induziert ist. Phylogenetische Analysen zeigen außerdem

eine enge Verwandtschaft von OsGRAS23 aus Reis (*Oryza sativa*) mit der LISCL Gruppe. Xu *et al* (2015) zeigen, dass *OsGRAS23* durch Trockenstress induziert ist und die Überexpression dieses Faktors die Trockentoleranz in Reispflanzen erhöht. Diese Autoren bestätigen weiterhin, dass Stress-verwandte Gene, die für z.B. ROS-Schutzproteine (Peroxiredoxin, Peroxidasen, Glutathion-S-Transferase) codieren, induziert sind. In *Arabidopsis thaliana* interagiert AtSCL14 mit TGA, einem Klasse 2 bZIP-TR und aktiviert dadurch eine Gruppe von Genen, die in pflanzlichen Entgiftungsprozessen von Xenobiotika und möglichen schädlichen endogenen Substanzen involviert sind (FODE *et al.*, 2008). Trockenstress bewirkt einen starken Anstieg von ROS, mit der Folge, dass oxidative Schäden von Proteinen, Lipiden und DNA das pflanzliche Wachstum und die Produktivität negativ beeinflussen und schließlich zum Zelltod führen (APEL & HIRT, 2004; FAROOQ *et al.*, 2009). Der in Tadmor induzierte GRAS-TR könnte demnach mit einer erhöhten Trockentoleranz durch verbesserte Entgiftungsprozesse in Zusammenhang stehen.

5.3.1.4 ARR-TR sind unter Trockenstress in Tadmor und Scarlett reprimiert

Mitglieder der ARR (*Arabidopsis response regulators*) - Genfamilie sind in beiden Kultivaren unter Trockenstressbedingungen signifikant reprimiert. Die Funktion von ARRs im Trockenstressgeschehen ist bisher kaum erforscht. Jedoch ist bekannt, dass sie in der Signalwirkung des Phytohormons Cytokinin (CK) involviert sind (HWANG *et al.*, 2012). Bei der Anpassung von Pflanzen an Trockenstress ist ein *crosstalk* zwischen ABA- und CK-Signalwegen sowie die Homöostase beider Phytohormone entscheidend (PELEG & BLUMWALD, 2011; HA *et al.*, 2012). Unter Trockenstress bewirkt die Akkumulation von ABA die Biosynthese von Schutzproteinen, das Schließen der Stomata und die Beschleunigung der Seneszenz. Im Gegensatz dazu verzögert CK diese Prozesse. Unter Trockenstressbedingungen hemmt daher vermutlich ABA die Biosynthese und Signalwirkung der CK (ZWACK & RASHOTTE, 2015; HWANG *et al.*, 2012; NISHIYAMA *et al.*, 2011). NGUYEN *et al* (2016) fanden heraus, dass die Expression der Gene *AtARR1*, *AtARR10*, und *AtARR12* in *Arabidopsis thaliana* durch Trockenstress reprimiert werden. Die Stilllegung dieser und weiterer Gene der CK-Signalwirkung könnte eine Anpassungs-Strategie von Pflanzen an Trockenstressbedingungen erklären.

5.3.1.5 Ein MYB-related-TR (*AtRL5*) ist unter Trockenstress in Scarlett reprimiert

RAD-like (RL)-TR sind eine Untergruppe der MYB-TR. In Scarlett ist ein MYB-related-TR (AK376021) im Verlauf des Trockenstress-Experiments stark reprimiert. Im Gegensatz dazu ist das relative Transkriptlevel im trockenoleranten Kultivar Tadmor sowohl unter Trockenstress als auch unter Kontrollbedingungen extrem gering. Einige Mitglieder der RL-Genfamilie sind bei der Blütenentwicklung beteiligt (BAXTER *et al.*, 2007). Jedoch ist die genaue Funktion dieser TR noch unbekannt. Der identifizierte MYB-related-TR ist dem Gen *AtRL5* (*RAD-like 5*) in *Arabidopsis thaliana* ortholog. WICKRAMASURIYA & DUNWELL (2015) fanden heraus, dass *AtRL5* im Verlauf der Embryogenese reprimiert ist. Trockenstress-Analysen mit *Lotus japonicus* und *Ribes nigrum* ergaben ebenfalls eine starke Repression für ein jeweiliges *AtRL5*-orthologes Gen (BETTI *et al.*, 2012; ČEREKOVIĆ *et al.*, 2015).

5.3.2 Polyamine

Polyamine haben, neben Wachstums- und Entwicklungsprozessen, eine wichtige Funktion in der pflanzlichen Stressantwort. Die Funktion einzelner Gene des PA-Metabolismus unter Trockenstress ist gut untersucht (Überblick in HUSSAIN *et al.*, 2011). Die Microarray-Analysen zeigen Unterschiede im trockenstress-abhängigen Expressionsmuster einzelner identifizierter Gene des PA-Metabolismus in Scarlett und Tadmor.

Die Biosynthese der PA erfolgt über zwei Wege. In einem Weg wird Putrescin durch das Enzym ADC gebildet. In *Hordeum vulgare* codiert *HvADC* (AK376935) für dieses Enzym. Dieses Gen ist in Scarlett im Trockenstress-Verlauf induziert, in Tadmor hingegen nicht. In *Arabidopsis thaliana* sind zwei Gene *AtADC1* und *AtADC2* bekannt. Letzteres ist dem *HvADC* ortholog und wird ebenfalls durch Trockenstress induziert (ALCÁZAR *et al.*, 2006). Transgene Studien mit von *Arabidopsis thaliana*, Reis, Tomate und Aubergine belegen einen Zusammenhang zwischen der verbesserten Trockentoleranz und dem Anstieg der ADC-Expression (ALCÁZAR *et al.*, 2006; PEREMARTI *et al.*, 2009 und 2010; CAPELL *et al.*, 1998 und 2004; WANG *et al.*, 2011; PRABHAVATHI & RAJAM, 2007). Die Akkumulation von Putrescin in der Pflanze durch die Überexpression von *ADC2* korreliert dabei mit einer verringerten Öffnung der Stomata und Transpirationsrate (ALCÁZAR *et al.*, 2010). Im Gegensatz dazu ist *HvADC2* in Tadmor vermutlich nicht induziert, da es als trockenolerantes Kultivar bereits eine geringe Transpirationsrate und stomatäre Leitfähigkeit besitzt (HAVAUX & TARDY, 1999; TEULAT, 2001).

Ein weiteres wichtiges Biosynthese-Enzym ist die SAMDC. Dieses Enzym liefert die Aminopropylgruppe für die Bildung von Spermidin und Spermin. Überexpressionsstudien von *SAMDC* in *Arabidopsis thaliana*, Tabak und Reis zeigen Pflanzen mit einer verbesserten Trockentoleranz (ALCÁZAR *et al.*, 2006; PEREMARTI *et al.*, 2009; WAIE & RAJAM, 2003). Der erhöhte Gehalt von Spermin induziert die Genexpression von *NCED3*, einem Schlüsselenzym der ABA-Biosynthese (ALCÁZAR *et al.*, 2006). Die vermutete Induktion der beiden *HvSAMDC-Gene* (AK252992 und AK365592) unter Trockenstress konnte weder in Scarlett noch in Tadmor festgestellt werden.

Im letzten Schritt der PA-Biosynthese katalysieren die Enzyme SPDS und SPMS die Umwandlung von Putrescin in Spermidin und Spermin. GUO *et al.*, 2009 identifizierten eine SPDS in *Hordeum vulgare*, die in zwei trockenoleranten Kultivaren signifikant durch Trockenstress induziert ist. Im Gegensatz dazu sind die zwei *HvSPDS* (AK376906 und AK250159) in Scarlett und Tadmor unter Trockenstressbedingungen nicht reguliert. Weiterhin untersuchten YAMAGUCHI *et al.* (2007) *acl5/spms*-Mutanten von *Arabidopsis thaliana*, die kein Spermin produzieren können. Diese Pflanzen reagieren sehr sensitiv auf Trockenstress, da sie ihre Stomata nicht schließen können, um dem Wasserverlust entgegenzuwirken. Die Microarray-Analysen zeigen hingegen, dass *HvSPMS* (AK362530) nicht wie erwartet, in Tadmor, sondern im trockenensensitiven Kultivar Scarlett induziert wird.

Der Zusammenhang zwischen Veränderungen im PA-Gehalt und der Anpassung an Trockenstress wird sehr konträr diskutiert (POTTOSIN & SHABALA *et al.*, 2014) und ist vermutlich spezifisch für einzelne Pflanzenarten. Wie bereits erwähnt, belegen zahlreiche Publikationen eine positive Korrelation zwischen einem erhöhten PA-Gehalt und einer verbesserten Trockentoleranz. DO *et al.*, 2013 konnten dagegen keinen Zusammenhang zwischen dem PA-Gehalt und der Trockentoleranz in Reis feststellen.

Der Gehalt von Polyaminen in der Pflanze wird auf verschiedenen Wegen moduliert. Zahlreiche Hinweise deuten darauf hin, dass PA-Biosynthese-Enzyme nicht nur auf transkriptioneller Ebene kontrolliert werden, sondern die Regulation ihrer Aktivität auch translational und posttranslational erfolgt (HU *et al.*, 2005; CHANG *et al.*, 2000, HANFREY *et al.*, 2002). Ebenso beeinflussen Degradationsprozesse durch PAOs und DAOs den PA-Gehalt. *HvPAO1* und *HvPAO2* sind zwei Isoformen der PAOs in *Hordeum vulgare* (CERVELLI *et al.*, 2001). Unter Trockenstress sind beide Gene in Tadmor stärker induziert und in den Kontroll-Pflanzen interessanterweise in beiden Kultivaren reprimiert. Beim Abbau von

Spermin zu Spermidin und Putrescin durch PAOs entsteht H_2O_2 (CONA *et al.*, 2003). H_2O_2 reguliert die Bewegung der Stomata und optimiert somit Wassernutzungs-Effizienz unter Trockenstress (XU *et al.*, 2010). H_2O_2 gehört zur Gruppe der ROS, welche auch eine sehr wichtige Funktion als *second messenger* in der Signaltransduktion der Stressantwort haben (TUTEJA & SOPORY, 2008; FOYER & NOCTOR, 2005; VANDENBROUCKE *et al.*, 2008). In diesem Zusammenhang könnte die Induktion der *HvPAO-Gene* in Tadmor die Genexpression verschiedener regulatorischer und funktioneller Gene für die Ausbildung der Trockentoleranz auslösen.

Die Funktion der PAs im Trockenstressgeschehen ist sehr komplex. Dabei ist die Ausbildung der Trockentoleranz vermutlich stark abhängig vom jeweiligen Anteil und Gleichgewicht einzelner PAs Putrescin, Spermidin und Spermin (PEREMARTI *et al.*, 2009). Aus diesem Grund muss in weiterführenden Experimenten der Gehalt der einzelnen PAs unter Trockenstress in Scarlett und Tadmor ermittelt und verglichen werden.

VI Material und Methoden

6.1 Material

6.1.1 Pflanzenmaterial

Für die Trockenstress-Experimente wurden verschiedene Kultivare von *Hordeum vulgare* hinsichtlich ihrer Trockentoleranz untersucht. Hierfür war es zunächst notwendig das Saatgut aller Kultivare zu vermehren (siehe Kapitel 6.1.2). Dabei entsprachen die Tochtergenerationen sowohl phänotypisch als auch physiologisch den jeweiligen Eltern. Tabelle 6.1 dokumentiert alle analysierten Kultivare mit ihrer jeweiligen Herkunft und in der Literatur beschriebenen Eigenschaften. Dabei wurden das trockenoleranteste Kultivar Tadmor und das trocken sensitivste Kultivar Scarlett für weitere detaillierte Untersuchungen bestimmt. Das Ausgangssaatgut der einzelnen Kultivare wurde von folgenden Quellen bezogen: *Hordeum vulgare* L. cv. Scarlett (Breun Seed GmbH & Co. KG, Morgenrot 12, D-06484 Quedlinburg), *Hordeum vulgare* L. cv. Er/Apm und *Hordeum vulgare* L. cv. Tadmor von der AG VON KORFF am Max-Planck-Institut (MPI) für Pflanzenzüchtungsforschung, Carl-von-Linné-Weg 10, D-50829 Köln; Morocco9-75 von Herrn Dr. Michael Baum am International Center for Agricultural Research in the Dry Areas (ICARDA), PO Box 5466, Aleppo, Syrien; *Hordeum spontaneum* und *Hordeum agriocrithon* vom Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK) Gatersleben, Corrensstraße 3, D-06466, Stadt Seeland; *Hordeum vulgare* L. cv. Lomerit von der AG KRUPINSKA am Botanisches Institut, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, Am Botanischen Garten 1-9, D-24118 Kiel; *Hordeum vulgare* L. cv. Kendo und *Hordeum vulgare* L. cv. Merlot von der AG ORDON am Julius-Kühn-Institut (JKI) Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen, Versuchsstation zur Kartoffelforschung Groß Lüsewitz, OT Groß Lüsewitz, Rudolf-Schick-Platz 3, D-18190 Sanitz; *Hordeum vulgare* L. cv. Marthe und ausgewählte Introgressionslinien (Hintergrund-Kultivar: *Hordeum vulgare* L. cv. Scarlett) von der AG PILLEN am Institut für Agrar- und Ernährungswissenschaften (IAEW), Pflanzenzüchtung, Martin-Luther.-Universität Halle-Wittenberg, Betty-Heimann-Str. 3, D-06120 Halle (Saale).

Tabelle 6.1 Übersicht der untersuchten *Hordeum vulgare* Kultivare unter Trockenstressbedingungen. Tadmor, die toleranteste Linie und Scarlett, die sensitivste Linie sind grau hervorgehoben. (S – Sommergerste; W – Wintergerste; 2 – zweizeilige Ähren; 6 – sechszeilige Ähren; B – bespelzte Körner)

Kultivar	Quelle	Typ	Züchter	Zulassung	Eigenschaften unter Trockenstress	Abstammung
Er/Apm	MPI Köln (AG VON KORFF)	S2	ICARDA	1997		
Tadmor	MPI Köln (AG VON KORFF)	W2	ICARDA	entstanden 1984/85	tolerant	selection from a black seeded Syrian landrace (Arabi Aswad), aus einer Ähre (Ar-Raqqa-Provinz/Syrien)
H. spontaneum	IPK Gatersleben					
H. agriocrithon	IPK Gatersleben					
Lomerit	Uni Kiel (AG KRUPINSKA)	W6B	V.LOCHOW	2001		Askanova x Grete x Oceane x (1332-29)
Morocco9-75	ICARDA	S			sensitiv (CECCARELLI, 1994)	
W12291	ICARDA	S	WRI	1985/86 Test	sensitiv (CECCARELLI, 1994)	line from Australia C13576/Union*2
Marthe	IAEW Halle/Saale (AG PILLEN)	S	NORDSAAT	2005		
Kendo	JKI Groß Lüsewitz (AG ORDON)	W6B	V.LOCHOW	1987		Pamina x Ambio x Marko
Merlot	JKI Groß Lüsewitz (AG ORDON)	W6B	NORDSAAT	2002		Theresa x Carola
Scarlett	BREUN Seed GmbH & Co. KG	S2B	BREUN	1995		(Amazona x Br.2730e) x Kym
Introgressionslinien	IAEW Halle/Saale (AG PILLEN)	S				

6.1.2 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien wurden, sofern nicht weiter spezifiziert, in analytischer Qualität („*pro analysis*“) von den Firmen Agilent Technologies (Waldbronn, www.agilent.com/home), Biozym Diagnostics GmbH (Oldendorf, www.biozym.com), Calbiochem® (San Diego, USA, www.calbiochem.com), Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, www.carl-roth.de), GE Healthcare (München), Merck Eurolab GmbH (Darmstadt, www.merckeurolab.de), Diagonal GmbH & Co. KG (Münster, www.diagonal.de), Duchefa (Haarlem, Niederlande, www.duchefa.com), MBI Fermentas GmbH (St. Leon-Rot, www.fermentas.de), Invitrogen GmbH (Karlsruhe, www.invitrogen.com), Promega GmbH (Mannheim, www.promega.com), Roche-Diagnostics GmbH (Mannheim, www.roche.com/diagnostics) und Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München, www.sigma-aldrich.com) bezogen.

6.1.3 Puffer, Lösungen, Medien

Die Herstellung der verwendeten Puffer erfolgte mit entionisiertem Wasser, welches zuvor durch eine PURELAB Plus™-Wasseraufbereitungsanlage (USF Reinstwasser-systeme GmbH, Ransbach Baumbach) gereinigt und anschließend autoklaviert wurde.

6x DNA-Proben-Ladepuffer

60% (v/v) Glycerol (99,6%)
60mM Natrium-EDTA
0,01% (w/v) Bromphenolblau, autoklavieren

Dye

50% (v/v) Glycerin
0,04% (w/v) Bromphenolblau, autoklavieren

Ethanol-Lösung (70%-ig)

70% (v/v) Ethanol reinst

Formamid (deionisiert)

5% (w/v) AG[®] 501-X8 (D) Resin,
1h unter dem Abzug rühren, danach durch einen
Faltenfilter in eine dunkle sterile Flasche
filtrieren

Größen-Marker

ribosomale RNA aus *E. coli*
vor Gebrauch werden 2,5µl des Markers
[entspricht ca. 5µg RNA] in 12µl Probenpuffer
aufgenommen

10x MOPS-Laufpuffer (pH 7,2)

0,4M MOPS
0,1M Natriumacetat
10mM Natrium-EDTA
pH 7,2 mit 5N NaOH einstellen, autoklavieren

4 M NaCl-Lösung

4M Natriumchlorid, autoklavieren

Probenpuffer

50% (v/v) deionisiertes Formamid [mit 5% (w/v)
AG[®]501-X8 (D) über Filter deionisiert]
20% (v/v) Dye [50% (v/v) Glycerin, 0,04% (w/v)
Bromphenolblau, autoklavieren]
3% (v/v) steriles deionisiertes Wasser
17% (v/v) Formaldehyd
10% (v/v) 10x MOPS-Laufpuffer (pH 7,2)

50x TAE-Puffer (pH 8)

2 M Tris-Base
50mM Na-EDTA
pH 8 mit Essigsäure einstellen, autoklavieren

Trizol

0,8M Guanidiumthiocyanat,
0,4M Ammoniumthiocyanat,
0,1M NaAc (pH 5)
5% (v/v) Glycerol (99,8%) steril,
38% (v/v) Phenol (TE gesättigt pH 5)

6.1.4 Biochemische Materialien

6.1.4.1 Enzyme

DNaseI recombinant, RNase-free	Roche-Diagnostics GmbH, Mannheim
M-MuLV Reverse Transcriptase	Life Technologies GmbH
RiboLock™ RNase Inhibitor	Life Technologies GmbH
Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix UDG	Invitrogen

6.1.4.2 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland) bezogen und sind in Tabelle 6.2 dokumentiert.

Tabelle 6.2 Oligonukleotide und Nukleotidsequenz

Genname / Accession	Name	Nukleotidsequenz (5' → 3')
HvActin AY145451	HvActin_for	GGA AAT GGC TGA CGG TGA GGA C
	HvActin_rev	GGC GAC CAA CTA TGC TAG GGA AAA C
HvA1 X78205.1	HvA1_for	ACA CGG CGC AGT ACA CCA AGG AGT
	HvA1_rev	CCC ACC ACG GCG TTC ACC AC
HvS40 AJ310379	HvS40_for	CGA CGG CGA CGT CCG ATG TA
	HvS40_rev	CTT TGA GCG TCC TCC CTT TGC
Dehydrin 1 AF043087	HvDhn1_for	CCA TCA AGT CGC CCG CTC GT
	HvDhn1_rev	GGC GGC ACA TCA GCC TGC TA
HSP17 Y07844	HvHsp17_for	TCG AGA TCT CCG GCT GAA TGC
	HvHsp17_rev	CGG CAA GAA CAA CGA CAC AAC
JMJD5 AK372811	Hv08875_for	TCG GCG ATG TGC TCA AAC TTC
	Hv08875_rev	GCC GCT CGA TTC GCT TAC AA
AK362981	Hv11238_for	CAT CCA GTA GGC AGT CAG TAG C
	Hv11238_rev	GTC CAA AGT CCA AAC ACA CGG
HY5 AK375694	Hv04202_for	AAA AAC ACT ACC GGT AAC AAG AGA
	Hv04202_rev	CAC AAT GAA GTA GCG TAG CAG ATA
SCL14 AK357996	Hv17201_for	GGA GCA CTA CCA CAA GGA CT
	Hv17201_rev	AAC ACG CAG AAC ACT TCC AG
CBF4 DQ445244	Hv08918_for	TCC ACG CGA CTG GGT CAT TT
	Hv08918_rev	GTC CTT GAT CTC TTG CGC GG

Tabelle 6.2 Fortsetzung

AK369809	Hv09968_for	GGT GCC GGT GCT GGT TTT
	Hv09968_rev	CTC CCC CTT GCC GAT GTC
RL5 AK376021	Hv17807_for	GCT TAT GTG CTC TTG CGT TGT AT
	Hv17807_rev	CAG TGT CGA TCC CTT TTT ATT TTA
AK362109	Hv28577_for	GTG CCG TCT ATG ATT GTG CC
	Hv28577_rev	ATG ACA GGA TGA GTT GGT GAC T
ADC2 AK376935	Hv43167_for	GCG CCG CCG AGG ACG ATG ACG AG
	Hv43167_rev	GGT TGG GCC GGT GAT AAT AGG TA
SAMDC AK365592	Hv37178_for	CCT GGC TCC CTG GTT TAC AG
	Hv37178_rev	GAA GCA TGA CAG CAC CCT CT
SAMDC AK252992	Hv39521_for	GAG GGC GAG AAT GTG GAG AG
	Hv39521_rev	CGG AAC AGC GAC AGC AAA AA
SAM MTases AK376906	Hv15626_for	TCG CGA GGA ACT ATT TTG GAC TG
	Hv15626_rev	ATG GCG GCG CAC TGA CAC
SPDS2 AK250159	Hv39514_for	ACG GAG GGG CCT AGT GTT GAT T
	Hv39514_rev	GAG CGG CCC CTT GGA TTT T
SPMS AK362530	Hv01682_for	CCT GGC GGC GTT CTG TCT AAT
	Hv01682_rev	ACG CCG CCC TTG AAT ACC TC
HvPAO1 AJ298131	Hv03745_for	AGG CGG ATC GAG CAG CAG TC
	Hv03745_rev	GAT GGG CCA GTT GGA GAA GGT
HvPAO2 AJ298132	Hv08835_for	GTT GGC GGG CGG GTC TAC T
	Hv08835_rev	GTT GTT GGA GGC CTT GTT CAT CAG

6.1.4.3 Kit's

RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit	Thermo Fisher Scientific
One Color RNA Spike-In Kit	Agilent Technologies
Low Input Quick Amp Labeling Kit, one-color	Agilent Technologies
RNeasy MiniKit	Qiagen
Gene Expression Hybridization Kit (catalog no. 5188-5242)	Agilent Technologies
Gene Expression Wash Buffer Kit (catalog no. 5188-5327)	Agilent Technologies
Stabilization and Drying Solution (catalog no. 5185-5979)	Agilent Technologies

6.2 Methoden

6.2.1 Pflanzenanzucht und Saatgutvermehrung

6.2.1.1 Pflanzenanzucht

Für die Keimung wurde das Saatgut in abgedunkelten Anzuchtschalen auf feuchtem Filterpapier stratifiziert (48h, 4°C) und dann bei Raumtemperatur 24h vorgekeimt. Im Anschluss wurden zehn Samen pro 5L Mitscherlich-Gefäße, gefüllt mit 1,5kg Erde Typ 'ED73' (Einheitserdewerk Hameln, Deutschland, pH 5.8) ausgesät. Die Pflanzenanzucht erfolgte unter folgenden Bedingungen: 16h Licht, 21°C / 8h Dunkel 18°C, 45–50% relative Feuchte, Beleuchtung von 100klx.

6.2.1.2 Saatgutvermehrung

Die Keimung und Anzucht erfolgte für die Sommergersten-Kultivare wie unter 6.2.1 beschrieben. Die Wintergersten wurden für 6-8 Wochen vernalisiert (16h Licht / 8h Dunkel, 45–50% relative Feuchte, Beleuchtung von 100klx). Die Temperatur wurde abhängig vom Kultivar zwischen 0-10°C gewählt. Im Anschluss wurden die Pflanzen dann allmählich an die beschriebenen Anzuchtbedingungen (siehe Kapitel 6.2.1) akklimatisiert. Nach der Ernte wurde das Saatgut bis zur Verwendung dunkel bei 4°C gelagert.

6.2.2 Trockenstress-Experimente auf Erde

6.2.2.1 Trockenstress-Testsystem

Das Testsystem für die Trockenstress-Experimente wurde in der AG HUMBECK unter Nutzung der Gersten-Sorte *Hordeum vulgare* L. cv. Scarlett etabliert. Hierfür wurden die Pflanzen unter beschriebenen Bedingungen (siehe Kapitel 6.2.1.1) angezogen (10 Mitscherlich-Gefäße je Sorte). Um einen relativen Wassergehalt der Erde (rSWC - *relative soil water content*) von 70% sicherzustellen, wurden jedem Gefäß nach der Aussaat 600ml Wasser hinzugefügt. Der rSWC wurde vor Versuchsbeginn aus dem Gewicht von 1,5kg wassergesättigter Erde ermittelt. Im Verlauf der Experimente wurden die Gefäße täglich gewogen, gewässert (70% rSWC) und randomisiert. Am vierten Tag nach Aussaat (das - *days after sowing*) stoppte die Bewässerung für die Hälfte der Pflanzen. Die Kontroll-Pflanzen wurden weiterhin kontinuierlich über den gesamten Zeitraum des Experiments gewässert. Der Vorteil dieser Methode ist der Effekt des langsamen Austrocknens, wie es auch unter natürlichen Bedingungen stattfindet.

6.2.2.2 Trockenstress-Stadien und Probennahme

Während des Trockenstress-Experiments wurde der rSWC täglich durch das Wiegen der Gefäße ermittelt. In Relation zum rSWC vom Beginn des Experiments (70%) wurde der prozentuale Wert kalkuliert. Daraufhin wurden für alle folgenden physiologischen und molekularen Untersuchungen spezifische Trockenstress-Stadien festgelegt: 40% \approx 12das (T1), 20% \approx 21das (T2), 15% \approx 24das (T3), 12% \approx 27das (T4), 10% \approx 31das (T5), <10% \approx 34das (T6), <10% \approx 38das (T7), <10% \approx 49das (T8).

Alle Messungen und Blattprobennahmen erfolgten an den Primärblättern der Pflanzen und in der Mitte der Licht-Periode. Für die physiologischen Analysen wurden vier Blätter verschiedener Pflanzen geerntet und weitere fünf Blätter (Doppelproben) verschiedener Pflanzen wurden für die molekularen Analysen sofort in Flüssigstickstoff schockgefroren und bei -80°C für weitere Untersuchungen gelagert.

6.2.3 Physiologische Untersuchungen

6.2.3.4 Messung der Chlorophyll-Fluoreszenz (PSII-Effizienz)

Die Messung der Chlorophyll-Fluoreszenz erfolgte mittels Fluorometer (IMAGING-PAM, Puls-Amplituden moduliert, Heinz Walz GmbH, Effeltrich) nach der Methode von HUMBECK *et al.*, 1996. Dabei wurde das mittlere Segment von je vier intakten Primärblättern bei Raumtemperatur gemessen. Nach 10-minütiger Dunkeladaption des Blattmaterials wurden die Grundfluoreszenz (F_0) bei einer Lichtintensität von $0,1\mu\text{E}(\text{m}^2\text{s}^{-1})$ und die Maximalfluoreszenz (F_M) bei einem kurzen Weißlichtpuls hoher Intensität (1s bei max. $1800\mu\text{E}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$) ermittelt. Die variable Fluoreszenz (F_V) resultiert aus der Differenz von maximaler und minimaler Fluoreszenz ($F_M - F_0$) und beschreibt die Chlorophyllfluoreszenz, die sich abhängig von der photosynthetischen Aktivität, ändert. Die Photosyntheseleistung (PSII-Effizienz) wurde daraufhin mit Hilfe folgender Gleichung ermittelt (GENTY *et al.*, 1989):

$$\frac{F_V}{F_M} = \frac{(F_M - F_0)}{F_M}$$

Abbildung 6.1 Berechnung der PSII-Effizienz
 F_0 – Grundfluoreszenz; F_M – Maximalfluoreszenz;
 F_V – variable Fluoreszenz ($F_M - F_0$)

Der Quotient aus variabler und maximaler Fluoreszenz (F_V/F_M) bestimmt die Effizienz, mit welcher die Reaktionszentren Lichtenergie absorbieren und innerhalb des PSII weiterleiten und stellt somit ein Maß der Quantenausbeute der PSII-Zentren dar (SCHREIBER *et al.*, 1995).

Zur Bestimmung der einzelnen Messpunkte wurden jeweils min. vier Einzelmessungen zu den definierten Zeitpunkten durchgeführt und gemittelt.

6.2.3.5 Messung des relativen Chlorophyllgehaltes

Die Messung des relativen Chlorophyllgehaltes erfolgte durch Transmissionsmessung mittels SPAD-Analyzer (*Soil Plant Analysis Development*) (Minolta, Hydro Agri, Dülmen, Deutschland). Dabei wurde das mittlere Segment von je vier intakten Primärblättern dreimal bei Raumtemperatur gemessen. Die Transmission von zwei Wellenlängen, 650nm und 940nm wird gemessen und pro Blattfläche als relativer Chlorophyllgehalt ermittelt. Die relativen SPAD-Werte sind über einen großen Bereich linear vom Chlorophyllgehalt abhängig (HUMBECK & KRUPINSKA, 2003). Zur Bestimmung der einzelnen Messpunkte wurden jeweils min. 12 Einzelmessungen zu den definierten Zeitpunkten durchgeführt und gemittelt.

6.2.4 Molekulargenetische Methoden

6.2.4.1 Isolation von Gesamt-RNA aus *Hordeum vulgare*

Die Isolierung der Gesamt-RNA erfolgte nach der Trizol-Methode. Es wurden ausschließlich sterile Lösungen, Gefäße und Geräte verwendet. Das Trizol-Reagenz dient der Stabilisierung der RNA. Es beinhaltet das chaotrope Salz Guanidiniumthiocyanat, welches die Zellen aufschließt, Proteine und DNA-Protein-Komplexe durch Wasserentzug denaturiert und damit inaktiviert. Das Pflanzenmaterial (fünf intakte Primärblätter von *Hordeum vulgare*) wurde zunächst in einem vorgekühlten Mörser unter Verwendung von flüssigem Stickstoff fein pulverisiert und in vorgekühlte 2ml Eppendorfgefäße überführt. Nach der anschließenden Zugabe von 1ml temperierten Trizol (60°C) wurde das Pflanzenmaterial homogenisiert und für mindestens 10min im Wasserschüttelbad (60°C) inkubiert. Die unlöslichen Zelltrümmer wurden abgetrennt (10min, 13.000rpm, 4°C, Hettich Zentrifugen, Universal 320R) und der Überstand in ein neues 1,5ml Eppendorfgefäß überführt. Nach Wiederholung dieser Trennung wurde nun der Überstand mit 200µl Chloroform versetzt und intensiv geschüttelt.

Nach einer Inkubation (5min, RT) wurde das Gemisch erneut zentrifugiert (15min, 13.000rpm, 4°C) und im Anschluss die obere wässrige Phase vorsichtig in ein neues 1,5ml Eppendorfgefäß überführt. Die erste Fällung erfolgt mit 500µl eiskaltem Isopropanol (über Nacht bei -20°C). Am nächsten Tag wurde die RNA nach der Zentrifugation (10min, 13.000rpm, 4°C) mit 1ml 70% Ethanol gewaschen (5min, 13.000rpm, 4°C), getrocknet (10min unter sterilen

Bedingungen) und in 40µl DEPC-behandeltem Wasser resuspendiert (10min, 65°C, kräftig geschüttelt). Nach einer Zentrifugation (30min, 20.000rpm, 4°C) wurde der Überstand in ein neues 1,5ml Eppendorfgefäß überführt. Durch die Zugabe von 2Vol. 100% Ethanol und 1/10Vol. 4M NaCl wurde die isolierte RNA erneut gefällt, zentrifugiert (10min, 13.000rpm, 4°C), gewaschen (200µl 70% Ethanol, 5min, 13.000rpm, 4°C), getrocknet (10min unter sterilen Bedingungen) und erneut in 40µl DEPC-behandeltem Wasser resuspendiert (10min, 65°C, kräftig geschüttelt). Nach abschließender Zentrifugation (30min, 20.000rpm, 4°C) wurde der Überstand mit der reinen gelösten RNA in ein neues 1,5ml Eppendorfgefäß überführt und bis zur weiteren Verwendung bei –80°C gelagert.

6.2.4.2 Photometrische Konzentrationsbestimmung der RNA

Der quantitative Nachweis von Nukleinsäuren erfolgte photometrisch mit Hilfe des NanoDrop® Spektrophotometers (ND-1000, Wilmington, USA) bei einer Extinktion von $\lambda=260\text{nm}$. Die Reinheit wird über zwei Quotienten beschrieben. Das Verhältnis von $\lambda=260\text{nm}$ zu $\lambda=280\text{nm}$ gibt Auskunft über die Kontamination mit Proteinen, wohingegen der Koeffizient aus $\lambda=260\text{nm}$ und $\lambda=230\text{nm}$ ein Maß für die Kontamination mit dem Lösungsmittel bzw. aromatischen/phenolischen Substanzen ist. Die Extinktion (E) von 1 bei einer Wellenlänge von $\lambda=260\text{nm}$ entspricht einer RNA-Konzentration von $40\text{ng}/\mu\text{l}$. Die Konzentration der isolierten Nukleinsäure wurde über folgende Gleichung ermittelt:

$$c \text{ RNA } [\text{ng } \mu\text{l}^{-1}] = E_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 40\text{ng } \mu\text{l}^{-1}$$

Abbildung 6.2 Berechnung der DNA-Konzentration
c – Konzentration E_{250} – Extinktion (λ) bei 260nm

Das Verhältnis aus $\lambda=260\text{nm}$ und $\lambda=280\text{nm}$ sollte bei einem Wert um 2 und der Quotient aus $\lambda=260\text{nm}$ und $\lambda=230\text{nm}$ zwischen 2 und 2,2 liegen.

6.2.4.3 Agarose-Gelelektrophorese

Nach der Isolation der RNA wurden 1%-ige (w/v) Agarose-Gele angefertigt (SAMBROOK *et al.*, 1989). Hierfür wurde je 1µg der RNA-Lösung mit 5µl Probenpuffer versetzt, für 15min bei 65°C denaturiert und anschließend elektrophoretisch getrennt (60min, 80-120V, 1xTAE). Nach einer Ethidiumbromid-Färbung (1µgml⁻¹, 20min) und anschließender Entfärbung (20min) in deionisiertem Wasser, konnte die Qualität der isolierten RNA überprüft und dokumentiert werden (raytest Isotopnegeräte GmbH, Diana II).

6.2.4.4 DNaseI-Verdau

Um mögliche Kontaminationen mit genomischer DNA zu entfernen, wurden 3,3µg Gesamt-RNA mit DNaseI (Roche) behandelt. Die Reaktion erfolgte im Thermocycler (Biometra®, Personal Cycler) bei 37°C und wurde nach einer Stunde durch die Zugabe von 0,7µl EDTA (250mM, Fermentas) und einer 10-minütigen Erhitzung auf 65°C gestoppt (Tabelle 4.7 und Tabelle 4.8). Die Lagerung der reinen RNA (29,95µl) erfolgte bis zur weiteren Verwendung bei -80°C.

Tabelle 6.3 DNaseI-Verdau Ansatz ($\Sigma = 29,95\mu\text{l}$)

DNaseI-Verdau Komponenten	Masse/Volumen
RNA	3,3µg
<i>Incubation buffer</i> (10×) (400mM Tris-HCl, 100mM NaCl, 60mM MgCl ₂ , 10mM CaCl ₂ , pH 7,9)	3µl
DNaseI recombinant, RNase-free (ROCHE)	1µl
RiboLock™ RNase Inhibitor (20U/µl)	0,25µl
EDTA (280mM)	0,7µl
MgCl ₂ (50mM)	1µl
steriles DEPC-behandeltes Wasser	ad 29,95µl

Tabelle 6.4 Programm: DNaseI-Verdau

Reaktionsschritt	Zeit	Temperatur in °C
1 DNaseI-Verdau	15min	37
2 Inaktivierung [Zugabe 0,7µl EDTA (280mM)]	10min	75
3 Abkühlung [Zugabe 1µl MgCl ₂ (50mM)]	∞	4

6.2.4.5 cDNA-Synthese

Für die Expressionsanalysen wurde die Methode der two step-qRT-PCR gewählt. Hierfür wurde zunächst je 1µg isolierte, DNaseI-behandelte RNA in cDNA umgeschrieben. Dieser Prozess der semiquantitativen, reversen Transkription erfolgte durch die eingesetzte M-MuLV Reverse Transkriptase (RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit, Thermo Fisher Scientific), einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase. Für die Reaktion wurden Oligo(dT)₁₈- und Random-Hexamer-Nukleotide eingesetzt. Die Lagerung der cDNA (20µl) erfolgte bis zur weiteren Verwendung bei 4°C.

Tabelle 6.5 cDNA-Synthese Ansatz (Σ = 20µl)

cDNA-Synthese Komponenten	Masse/Volumen
DNaseI-behandelte RNA	1µg
M-MuLV Reverse Transcriptase (20U/µl)	0,5µl
RiboLock™ RNase Inhibitor (20U/µl)	0,5µl
Random Hexamer Primer (100µM)	1µl
Oligo(dT) ₁₈ Primer (100µM)	0,5µl
dNTP Mix (10mM)	2µl
5x Reaktions-Puffer (250mM Tris-HCl (pH 8.3), 250mM KCl, 20mM MgCl ₂ , 50mM DTT)	4µl
steriles DEPC-behandeltes Wasser	ad 20µl

Tabelle 6.6 Programm: cDNA-Synthese

Reaktionsschritt	Zeit	Temperatur in °C
1 Denaturieren der RNA	5min	65
2 Abkühlen (auf Eis)	2min	0
3 Bindung der Oligonukleotide an die RNA	5min	25
4 reverse Transkription RNA in cDNA	60min	45
5 Inaktivierung	5min	70
6 Reaktionsende und Abkühlung	∞	4

6.2.4.6 Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR)

Die qRT-PCR (quantitative Real-Time-PCR) ist eine fluoreszenzbasierte PCR zur Quantifizierung von Nukleinsäuren mit dem Vorteil auch Transkripte, die in sehr geringen Mengen vorliegen, zu detektieren. Die Quantifizierung erfolgt durch die Messung der Fluoreszenz-Signale, die während eines PCR-Zyklus erfasst werden und mit zunehmender Menge an PCR-Produkt proportional ansteigen.

Nach der cDNA-Synthese (6.2.4.5) schließt sich im weiteren Verlauf der two step -qRT-PCR die spezifische Quantifizierung an. Dabei dient die einzelsträngige cDNA als Ausgangs-Template. Zur Quantifizierung der Transkriptmenge wurde der Fluoreszenzfarbstoff Fluorescein ($1\mu\text{g}\mu\text{l}^{-1}$) verwendet (Kat.-Nr.: 170-8780, Bio-Rad, Laboratories GmbH, München). Dieser interkaliert in doppelsträngige Nukleinsäuren, wobei im gebundenen Zustand eine deutlich höhere Fluoreszenz detektiert werden kann als im ungebundenen Zustand. Der Fluoreszenzanstieg in der exponentiellen Phase der PCR wird detektiert, mit einer speziellen Software ausgewertet und liefert Rückschlüsse auf den Gehalt des Ausgangs-Templates. Das bedeutet, je mehr Transkriptmoleküle eines spezifischen Gens in einer Probe vorhanden sind, desto eher kommt es zur Amplifikation und somit zu einem Kurvenanstieg. Für die Amplifikation der Ziel-Transkripte (*TOI-Transcript of Interest*) und des Referenztranskripts (*Ref-Reference*) wurden spezifische Primerpaare verwendet. Als Referenzgen wurde *HvActin* (Acc.: AY145451; JANSKÁ *et al.*, 2013), gewählt, dessen relatives Transkriptlevel auch bei veränderlichen Umweltbedingungen weitestgehend konstant bleibt. Aus diesem Grund können Schwankungen und Ungenauigkeiten, die hin und wieder bei den zahlreich aneinander gekoppelten Arbeitsschritten und technischen Differenzen entstehen, festgestellt und rechnerisch ausgeglichen werden. Die PCR-Platten (96 wells, Bio-RAD Laboratories, CA, USA) wurden entsprechend einem gewählten *plate-setup* beladen und mit einer transparenten PCR-Film-Folie (Eppendorf AG, Hamburg,) verschlossen. Nach einem Zentrifugationsschritt (4min, 4°C, 5.000rpm, Hettich Zentrifugen, Universal 320R), erfolgte die qRT-PCR (i-cycler, BioRad, München) mittels Platinum[®] SYBR[®] Green qPCR SuperMix UDG-Mix (Invitrogen GmbH).

Tabelle 6.7 qRT-PCR Ansatz ($\Sigma = 10\mu\text{l}$)

qRT-PCR Komponenten	Masse/Volumen
2× QuantiTect™ SYBR®-Green RR-Mix	5 μl
forward Primer (5 μM)	0,6 μl
reverse Primer (5 μM)	0,6 μl
Fluorescein (1 μM → Endkonz.: 1nm)	0,1 μl
Template	2 μl
steriles DEPC-behandeltes Wasser	1,7 μl

Um zu gewährleisten, dass auch Gene mit sehr geringen Transkriptmengen amplifiziert und somit detektiert werden können, wurde eine sehr hohe Zyklenzahl definiert.

Tabelle 6.8 Programm: qRT-PCR (T_m – Schmelztemperatur)

Reaktionsschritt	Zeit	Temperatur in °C
1 Initialtemperatur	15min	95
2 Denaturierung	2min	94
3 Annealing	25s	Primer-spezifisch
4 Elongation	30s	72
5 Abstoppen der Reaktion	20s	94
6 T_m der qRT-PCR Produkte	10s	58

} 45x
} 72x ($\frac{d}{T} [C^\circ] = +0,5^\circ C$)

Nach Ablauf der 50 Amplifikationszyklen erfolgte das Aufschmelzen aller entstandenen Produkte durch eine schrittweise Anhebung der Temperatur (von 58°C bis 99°C). Dabei kam es entsprechend der jeweiligen Schmelztemperatur (T_m) eines Produkts wieder zu einer Abnahme der Fluoreszenzintensität. Diese Fluoreszenzabnahme wurde durch eine Software aufgezeichnet und in Form einer Schmelzkurve dargestellt. Da die Schmelztemperatur eines Amplikons ein sehr spezifisches Merkmal ist, gibt die Schmelzkurvenanalyse Auskunft über die Spezifität der entstandenen PCR-Produkte.

Anhand der erhaltenen Daten konnten die relativen Expressionslevel berechnet werden. Die Basislinie (*TP-Threshold Point*) markiert für alle Proben den Schwellenwert zwischen signifikantem Fluoreszenzanstieg und Hintergrundfluoreszenz. Der Schnittpunkt der Basislinie mit der Fluoreszenzkurve, welcher sich immer in der exponentiellen Phase der Amplifikation befindet, wird als Ct-Wert (*Cycle threshold*) bezeichnet. Die Standardkurve gibt den linearen

Zusammenhang zwischen den Ct-Werten und dem Logarithmus der Konzentration des Standards (relative Template-Ausgangsmenge) wieder.

Den jeweiligen Expressionsdaten liegen mindestens drei unabhängige biologische Replikate mit jeweils drei technischen Wiederholungen zugrunde.

6.2.4.7 Berechnung der PCR-Effizienz (E)

Durch drei Verdünnungen des Standards kann über die zugehörigen Ct-Werte eine Eichgerade gebildet werden, welche sich durch eine Geradengleichung $y = f(x) = m \times x + n$ definieren lässt. Die PCR-Effizienz (E) steht in Abhängigkeit des Anstiegs (m) und wird mit folgender Gleichung berechnet:

$$\text{Effizienz (E)} = 10^{-1/m}$$

Abbildung 6.3 Berechnung der PCR-Effizienz (E)

E – PCR-Effizienz

m – Anstieg der Standardkurve

Unter optimalen PCR-Bedingungen kommt es pro Zyklus zu einer Verdopplung des eingesetzten Templates. Ein Wert von 2,0 entspricht demzufolge einer PCR-Effizienz von 100%. Aufgrund dessen ist die relative PCR-Effizienz ein sehr wichtiger Parameter bei der Interpretation der RTQ-Daten. Für die Expressionsanalysen wurden zunächst alle verwendeten Primerpaare (Tabelle 6.2) auf optimale PCR-Effizienzen überprüft.

6.2.4.8 Berechnung der relativen Expressionslevel: delta-delta Ct ($\Delta\Delta\text{Ct}$)-Methode

Für die Berechnung der relativen Expressionslevel müssen sowohl die PCR-Effizienz des jeweiligen TOI, als auch die PCR-Effizienz des Ref übereinstimmen. Die unterschiedliche relative Genexpression wird als n-fache Expression mit Hilfe des delta-delta-Ct($\Delta\Delta\text{Ct}$)-Wertes angegeben (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001)

$$\begin{aligned} \Delta\text{Ct} &= \text{Ct}_{\text{TOI}} - \text{Ct}_{\text{Ref}} \\ \Delta\Delta\text{Ct} &= \Delta\text{Ct} \text{ Behandlung (Trockenstress)} - \Delta\text{Ct} \text{ Kontrolle} \\ \text{relatives Expressionslevel} &= 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}} \end{aligned}$$

Abbildung 6.4 Berechnung des relativen Expressionslevels

ΔCt TOI - Differenz der Ct-Werte aus Kontrolle (Mittelwert) und Behandlung (Mittelwert) für TOI

ΔCt Ref - Differenz der Ct-Werte aus Kontrolle (Mittelwert) und Behandlung (Mittelwert) für Ref

$2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ - relatives Expressionslevel

6.2.4.9 Microarray-Analysen

Alle Produkte wurden von der Firma Agilent Technologies UK Ltd. (Wokingham, Berkshire, UK) bezogen und nach Gebrauchsanleitungen (<http://www.agilent.com>) verwendet. Der experimentelle Teil der Microarray-Analysen wurde in der AG WESCHKE (IPK, Gatersleben) durchgeführt. Das benutzerdefiniertes Microarray-Design (60K) für *Hordeum vulgare* wurde mittels Agilent Technologies eArray web-based application von der AG WESCHKE (IPK, Gatersleben) etabliert (Kohl *et al.*, 2015). Für die Microarray-Analysen wurden folgende Proben verwendet (Abbildung.6.5).

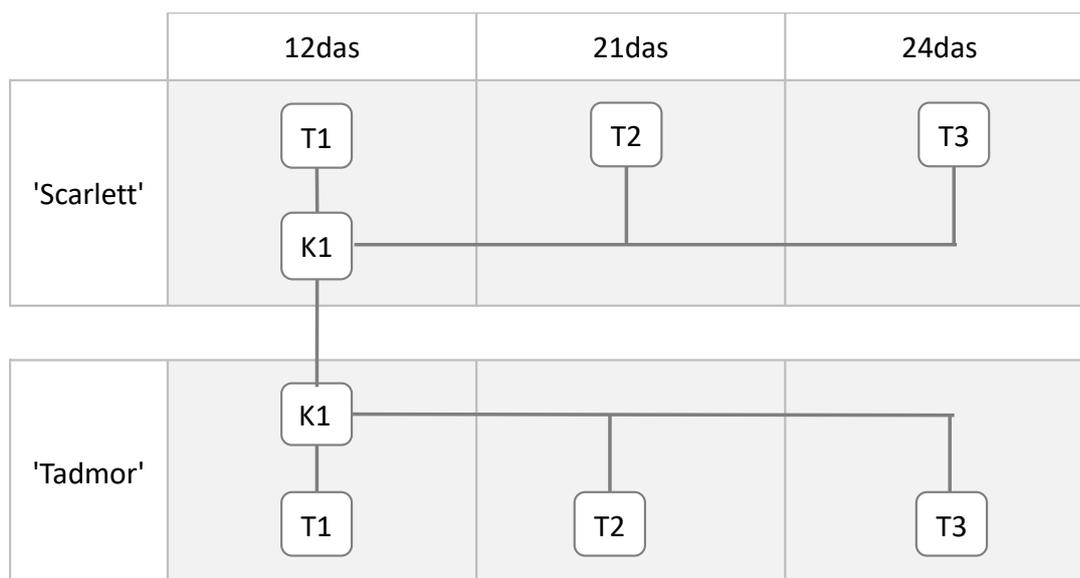


Abbildung 6.5 Probenset für die Microarray-Analysen (K – Kontrolle, T – Trockenstress)

Die RNA aus den Primärblättern von Scarlett und Tadmor wurde, wie in Kapitel 6.2.4.1 beschrieben, isoliert und mittels RNeasy®-Mini-Kit (QIAGEN) gereinigt. Die anschließende Vorbereitung und Markierung der Proben erfolgte entsprechend des Agilent „One-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis (Low Input Quick Amp Labeling)“ Protokolls (Version 6.5). Die Aufreinigung der markierten und amplifizierten cRNA erfolgte unter Nutzung des RNeasy MiniKit (Qiagen, Sussex, UK) nach den Angaben des Herstellers. Die Quantifizierung der cRNA erfolgte mittels NanoDrop ND-1000 UV-Vis spectrophotometer (NanoDrop Technologies, <http://www.nanodrop.com>).

Nach der Überprüfung der cRNA-Integrität mittels Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, <http://www.agilent.com>) erfolgte die Hybridisierung auf „custom-designed Agilent barley 8x60K“ Microarrays nach Kohl *et al.*, (2015). Die Microarray-Rohdaten (Agilent G2505C Microarray ScannerSystem) wurden daraufhin unter Nutzung der Software

Genespring V12.5 (Agilent Technologies) und der Hilfe von Stefan Kohl, AG WESCHKE (IPK, Gatersleben) bearbeitet aufgenommen. Nach dem Logarithmieren aller Werte und der Quantil-Normalisierung der Datensätze wurden die relativen Expressionslevel berechnet (*baseline transformation*). Die detektierten Signale jeder Probe ergeben sich dabei aus dem Mittelwert der Rohdaten-Signale von mindestens zwei unabhängigen biologischen Replikaten. Ausreißer-Daten und Proben, ohne signifikantem Signal zu einem der untersuchten Zeitpunkte, wurden entfernt. Die DRG wurden mittels einfaktorieller ANOVA und FDR-Korrektur (Benjamini–Hochberg) identifiziert ($p\text{-value} \leq 0.001$, asymptotic $p\text{-value}$ computation). Im weiteren Verlauf der Analyse wurden die Trockenstress-Stadien (T1, T2, T3) mit der jeweiligen Kontrolle K1 verglichen. Die Werte für beide Kultivare ergeben sich entsprechend aus der Differenz von T1, T2 und T3 mit K1. Der Vergleich von Tadmor und Scarlett unter Kontrollbedingungen K1 ergibt sich ebenfalls aus der Differenz beider Datensätze. (siehe Abbildung 6.5). Die funktionelle Analyse der DRG erfolgte mit dem Programmen MAPMAN und PAGEMAN (www.mapman.gabipd.org/pageman, THIMM *et al.*, 2004; USADEL *et al.*, 2005 und 2006).

6.2.4.10 Verifizierung der Kandidaten-Gene

Die Analyse der Sequenzdaten erfolgte unter Verwendung folgender Datenbanken: 'EST database viewer for barley' (HarVEST:Barley, www.harvest-web.org, CLOSE *et al.*, 2004), 'IPK BARLEY BLAST SERVER' (<http://webblast.ipk-gatersleben.de/barley>, ALTSCHUL *et al.*, 1997), 'National Center for Biotechnology Information' (NCBI, www.ncbi.nlm.nih.gov), 'Plant Transcription Factor Database' (PlantTFDB v.4.0, www.planttfdb.cbi.pku.edu.cn, JIN *et al.*, 2014), 'The Arabidopsis Information Resource' (TAIR, www.arabidopsis.org) sowie 'The Universal Protein Resource' (UniProt, www.uniprot.org). Das relative Expressionslevel der ausgewählten Kandidaten-Gene aus den Microarray-Analysen wurden mittels qRT-PCR verifiziert (siehe Kapitel 6.2.4.6). Die hierfür notwendigen Oligonukleotide wurden mit Hilfe der Software PrimerSelect™ (Lasergene® DNASTAR, <http://www.DNAstar.com>) generiert und auf ihre Funktionalität und Spezifität überprüft (Primer-Blast, NCBI Primer Tool, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) Alle untersuchten Primerpaare sind in der Tabelle 6.2. dokumentiert.

VII Literaturverzeichnis

- Akhtar, M., A. Jaiswal, G. Taj, J. P. Jaiswal, M. I. Qureshi, and N. K. Singh.** 2012. "DREB1/CBF Transcription Factors: Their Structure, Function and Role in Abiotic Stress Tolerance in Plants." *Journal of Genetics* 91 (3): 385–395.
- Alcázar, Rubén, Francisco Marco, Juan C. Cuevas, Macarena Patron, Alejandro Ferrando, Pedro Carrasco, Antonio F. Tiburcio, and Teresa Altabella.** 2006. "Involvement of Polyamines in Plant Response to Abiotic Stress." *Biotechnology Letters* 28 (23): 1867–1876.
- Alcázar, Rubén, Teresa Altabella, Francisco Marco, Cristina Bortolotti, Matthieu Reymond, Csaba Koncz, Pedro Carrasco, and Antonio F. Tiburcio.** 2010. "Polyamines: Molecules with Regulatory Functions in Plant Abiotic Stress Tolerance." *Planta* 231 (6): 1237–1249.
- Alcázar, Rubén, Juan C. Cuevas, Joan Planas, Xavier Zarza, Cristina Bortolotti, Pedro Carrasco, Julio Salinas, Antonio F. Tiburcio, and Teresa Altabella.** 2011. "Integration of Polyamines in the Cold Acclimation Response." *Plant Science* 180 (1): 31–38.
- Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schäffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, und D. J. Lipman.** 1997. „Gapped BLAST and PSI-BLAST: A New Generation of Protein Database Search Programs“. *Nucleic Acids Research* 25 (17): 3389–3402.
- Ang, Lay-Hong, Sudip Chattopadhyay, Ning Wei, Tokitaka Oyama, Kiyotaka Okada, Alfred Batschauer, and Xing-Wang Deng.** 1998. "Molecular Interaction between COP1 and HY5 Defines a Regulatory Switch for Light Control of Arabidopsis Development." *Molecular Cell* 1 (2): 213–222.
- Apel, Klaus, and Heribert Hirt.** 2004. "REACTIVE OXYGEN SPECIES: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction." *Annual Review of Plant Biology* 55 (1): 373–399.
- Atienza, Sergio G., Primetta Faccioli, Gaetano Perrotta, Giuseppe Dalfino, Wiebke Zschiesche, Klaus Humbeck, A. Michele Stanca, and Luigi Cattivelli.** 2004. "Large Scale Analysis of Transcripts Abundance in Barley Subjected to Several Single and Combined Abiotic Stress Conditions." *Plant Science* 167 (6): 1359–1365.
- Ay, Nicole, Ulrike Raum, Salma Balazadeh, Tina Seidensticker, Andreas Fischer, Gunter Reuter, and Klaus Humbeck.** 2014. "Regulatory Factors of Leaf Senescence Are Affected in Arabidopsis Plants Overexpressing the Histone Methyltransferase SUVH2." *Journal of Plant Growth Regulation* 33 (1): 119–136.
- Ay, Nicole, Bianka Janack, Andreas Fischer, Gunter Reuter, and Klaus Humbeck.** 2015. "Alterations of Histone Modifications at the Senescence-Associated Gene HvS40 in Barley during Senescence." *Plant Molecular Biology* 89 (1–2): 127–141.
- Badr, A., K. Müller, R. Schäfer-Pregl, H. El Rabey, S. Effgen, H. H. Ibrahim, C. Pozzi, W. Rohde, and F. Salamini.** 2000. "On the Origin and Domestication History of Barley (*Hordeum Vulgare*)." *Molecular Biology and Evolution* 17 (4): 499–510.
- Baldoni, Elena, Annamaria Genga, and Eleonora Cominelli.** 2015. "Plant MYB Transcription Factors: Their Role in Drought Response Mechanisms." *International Journal of Molecular Sciences* 16 (7): 15811–15851.

- Banerjee, Aditya, and Aryadeep Roychoudhury.** 2015. "WRKY Proteins: Signaling and Regulation of Expression during Abiotic Stress Responses." *The Scientific World Journal*.
- Barnabás, Beáta, Katalin Jäger, and Attila Fehér.** 2008. "The Effect of Drought and Heat Stress on Reproductive Processes in Cereals." *Plant, Cell & Environment* 31 (1): 11–38.
- Bartels, Dorothea, and Ramanjulu Sunkar.** 2005. "Drought and Salt Tolerance in Plants." *Critical Reviews in Plant Sciences* 24 (1): 23–58.
- Baxter, Catherine E. L., Maria Manuela R. Costa, and Enrico S. Coen.** 2007. "Diversification and Co-Option of RAD-like Genes in the Evolution of Floral Asymmetry." *The Plant Journal* 52 (1): 105–113.
- Betti, Marco, Carmen Pérez-Delgado, Margarita García-Calderón, Pedro Díaz, Jorge Monza, and Antonio J. Márquez.** 2012. "Cellular Stress Following Water Deprivation in the Model Legume *Lotus Japonicus*." *Cells* 1 (4): 1089–1106.
- Bhargava, Sujata, and Kshitija Sawant.** 2013. "Drought Stress Adaptation: Metabolic Adjustment and Regulation of Gene Expression." *Plant Breeding* 132 (1): 21–32.
- Blattner, Frank R.** 2009. "Progress in Phylogenetic Analysis and a New Infrageneric Classification of the Barley Genus *Hordeum* (Poaceae: Triticeae)." *Breeding Science* 59 (5): 471–480.
- Blum, Abraham.** 2016. "Osmotic Adjustment Is a Prime Drought Stress Adaptive Engine in Support of Plant Production." *Plant, Cell & Environment*.
- Bolle, Cordelia.** 2004. "The Role of GRAS Proteins in Plant Signal Transduction and Development." *Planta* 218 (5): 683–692.
- Bothmer, Roland Von, Ole Seberg, and Niels Jacobsen.** 1992. "Genetic Resources in the Triticeae." *Hereditas* 116: 141–150.
- Bothmer, Roland von, Kazuhiro Sato, Takao Komatsuda, Shozo Yasuda, and Gerhard Fischbeck.** 2003. "Chapter 2 - The Domestication of Cultivated Barley." In *Developments in Plant Genetics and Breeding*, edited by Theo van Hintum Roland von Bothmer Helmut Knüpfper and Kazuhiro Sato, 7: 9–27.
- Bouchereau, A, A Aziz, F Larher, and J Martin-Tanguy.** 1999. "Polyamines and Environmental Challenges: *Recent Development*." *Plant Science* 140 (2): 103–125.
- Breeze, Emily, Elizabeth Harrison, Stuart McHattie, Linda Hughes, Richard Hickman, Claire Hill, Steven Kiddle, et al.** 2011. "High-Resolution Temporal Profiling of Transcripts during Arabidopsis Leaf Senescence Reveals a Distinct Chronology of Processes and Regulation." *The Plant Cell* 23 (3): 873–894.
- Buchanan-Wollaston, Vicky, Simon Earl, Elizabeth Harrison, Evy Mathas, Saeid Navabpour, Tania Page, and David Pink.** 2003. "The Molecular Analysis of Leaf Senescence – a Genomics Approach." *Plant Biotechnology Journal* 1 (1): 3–22.
- Buchanan-Wollaston, Vicky, Tania Page, Elizabeth Harrison, Emily Breeze, Pyung Ok Lim, Hong Gil Nam, Ji-Feng Lin, et al.** 2005. "Comparative Transcriptome Analysis Reveals Significant Differences in Gene Expression and Signalling Pathways between Developmental and Dark/Starvation-Induced Senescence in Arabidopsis." *The Plant Journal* 42 (4): 567–585.

- Capell, T., C. Escobar, H. Liu, D. Burtin, O. Lepri, and P. Christou.** 1998. "Over-Expression of the Oat Arginine Decarboxylase CDNA in Transgenic Rice (*Oryza Sativa* L.) Affects Normal Development Patterns in Vitro and Results in Putrescine Accumulation in Transgenic Plants." *Theoretical and Applied Genetics* 97 (1–2): 246–254.
- Capell, Teresa, Ludovic Bassie, and Paul Christou.** 2004. "Modulation of the Polyamine Biosynthetic Pathway in Transgenic Rice Confers Tolerance to Drought Stress." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (26): 9909–9914.
- Carvalho, Maria Helena Cruz de.** 2008. "Drought Stress and Reactive Oxygen Species." *Plant Signaling & Behavior* 3 (3): 156–165.
- Castilhos, Graciela, Fernanda Lazzarotto, Leila Spagnolo-Fonini, Maria Helena Bodanese-Zanettini, and Márcia Margis-Pinheiro.** 2014. "Possible Roles of Basic Helix-Loop-Helix Transcription Factors in Adaptation to Drought." *Plant Science* 223: 1–7.
- Cattivelli, Luigi, Fulvia Rizza, Franz-W. Badeck, Elisabetta Mazzucotelli, Anna M. Mastrangelo, Enrico Francia, Caterina Marè, Alessandro Tondelli, and A. Michele Stanca.** 2008. "Drought Tolerance Improvement in Crop Plants: An Integrated View from Breeding to Genomics." *Field Crops Research* 105 (1): 1–14.
- Čereković, N., D. Jarret, Majken Pagter, D. W. Cullen, J. M. Morris, Pe E. Hedley, R. Brennan, and K. K. Petersen.** 2015. "The Effects of Drought Stress on Leaf Gene Expression during Flowering in Blackcurrant (*Ribes Nigrum* L.)." *European Journal of Horticultural Science* 80 (1): 39–46.
- Cervelli, Manuela, Alessandra Cona, Riccardo Angelini, Fabio Polticelli, Rodolfo Federico, and Paolo Mariottini.** 2001. "A Barley Polyamine Oxidase Isoform with Distinct Structural Features and Subcellular Localization." *European Journal of Biochemistry* 268 (13): 3816–3830.
- Chalker-Scott, Linda.** 1999. "Environmental Significance of Anthocyanins in Plant Stress Responses." *Photochemistry and Photobiology* 70 (1): 1–9.
- Chandra Babu, R, Jingxian Zhang, A Blum, T. -H David Ho, R Wu, and H. T Nguyen.** 2004. "HVA1, a LEA Gene from Barley Confers Dehydration Tolerance in Transgenic Rice (*Oryza Sativa* L.) via Cell Membrane Protection." *Plant Science* 166 (4): 855–862.
- Chang, Kwang Suk, Sun Hi Lee, Seong Bin Hwang, and Ky Young Park.** 2000. "Characterization and Translational Regulation of the Arginine Decarboxylase Gene in Carnation (*Dianthus Caryophyllus* L.)." *The Plant Journal* 24 (1): 45–56.
- Chaves, Manuela M., João P. Maroco, and João S. Pereira.** 2003. "Understanding Plant Responses to Drought — from Genes to the Whole Plant." *Functional Plant Biology* 30 (3): 239–264.
- Chen, Xiangsong, Yongfeng Hu, and Dao-Xiu Zhou.** 2011. "Epigenetic Gene Regulation by Plant Jumonji Group of Histone Demethylase." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms, Epigenetic control of cellular and developmental processes in plants*, 1809 (8): 421–426.
- Choi, D.-W., B. Zhu, and T. J. Close.** 1999. "The Barley (*Hordeum Vulgare* L.) Dehydrin Multigene Family: Sequences, Allele Types, Chromosome Assignments, and Expression Characteristics of 11 Dhn Genes of Cv Dicktoo." *Theoretical and Applied Genetics* 98 (8): 1234–1247.

- Christiansen, Michael W., Preben B. Holm, and Per L. Gregersen.** 2011. "Characterization of Barley (*Hordeum Vulgare* L.) NAC Transcription Factors Suggests Conserved Functions Compared to Both Monocots and Dicots." *BMC Research Notes* 4: 302.
- Close, Timothy J., Steve I. Wanamaker, Rico A. Caldo, Stacy M. Turner, Daniel A. Ashlock, Julie A. Dickerson, Rod A. Wing, Gary J. Muehlbauer, Andris Kleinhofs, and Roger P. Wise.** 2004. "A New Resource for Cereal Genomics: 22K Barley GeneChip Comes of Age." *Plant Physiology* 134 (3): 960–968.
- Cona, Alessandra, Francesco Cenci, Manuela Cervelli, Rodolfo Federico, Paolo Mariottini, Sandra Moreno, and Riccardo Angelini.** 2003. "Polyamine Oxidase, a Hydrogen Peroxide-Producing Enzyme, Is Up-Regulated by Light and Down-Regulated by Auxin in the Outer Tissues of the Maize Mesocotyl." *Plant Physiology* 131 (2): 803–813.
- Dai, Fei, Eviatar Nevo, Dezhi Wu, Jordi Comadran, Meixue Zhou, Long Qiu, Zhonghua Chen, Avigdor Beiles, Guoxiong Chen, and Guoping Zhang.** 2012. "Tibet Is One of the Centers of Domestication of Cultivated Barley." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109 (42): 16969–16973.
- Dixon, RA, and NL Paiva.** 1995. "Stress-Induced Phenylpropanoid Metabolism." *The Plant Cell* 7 (7): 1085–1097.
- Do, Phuc Thi, Thomas Degenkolbe, Alexander Erban, Arnd G. Heyer, Joachim Kopka, Karin I. Köhl, Dirk K. Hincha, and Ellen Zuther.** 2013. "Dissecting Rice Polyamine Metabolism under Controlled Long-Term Drought Stress." *PLOS ONE* 8 (4).
- Doebley, John F., Brandon S. Gaut, and Bruce D. Smith.** 2006. "The Molecular Genetics of Crop Domestication." *Cell* 127 (7): 1309–1321.
- Evans, P T and Malmberg, R. L.** 1989. "Do Polyamines Have Roles in Plant Development?" *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 40 (1): 235–269.
- Farooq, M., A. Wahid, N. Kobayashi, D. Fujita, and S. M. A. Basra.** 2009. "Plant Drought Stress: Effects, Mechanisms and Management." *Agronomy for Sustainable Development* 29 (1): 185–212.
- Fode, Benjamin, Tanja Siemsen, Corinna Thurow, Ralf Weigel, and Christiane Gatz.** 2008. "The Arabidopsis GRAS Protein SCL14 Interacts with Class II TGA Transcription Factors and Is Essential for the Activation of Stress-Inducible Promoters." *The Plant Cell Online* 20 (11): 3122–3135.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO).** 2009. "How to Feed the World in 2050". Rome.
- Forster, B P, R P Ellis, J Moir, V Talamè, M C Sanguineti, R Tuberosa, D This, et al.** 2004. "Genotype and Phenotype Associations with Drought Tolerance in Barley Tested in North Africa." *Annals of Applied Biology* 144 (2): 157–168.
- Foyer, Christine H., and Graham Noctor.** 2005. "Redox Homeostasis and Antioxidant Signaling: A Metabolic Interface between Stress Perception and Physiological Responses." *The Plant Cell Online* 17 (7): 1866–1875.
- Fu, Daolin, Bingru Huang, Yanmei Xiao, Subbaratnam Muthukrishnan, and George H. Liang.** 2007. "Overexpression of Barley Hva1 Gene in Creeping Bentgrass for Improving Drought Tolerance." *Plant Cell Reports* 26 (4): 467–477.

- Fujita, Yasunari, Miki Fujita, Kazuo Shinozaki, and Kazuko Yamaguchi-Shinozaki.** 2011. "ABA-Mediated Transcriptional Regulation in Response to Osmotic Stress in Plants." *Journal of Plant Research* 124 (4): 509–525.
- Galau, Glenn A., D. Wayne Hughes, and Leon Dure.** 1986. "Abscisic Acid Induction of Cloned Cotton Late Embryogenesis-Abundant (Lea) MRNAs." *Plant Molecular Biology* 7 (3): 155–170.
- Galston, A. W., and R. K. Sawhney.** 1990. "Polyamines in Plant Physiology." *Plant Physiology* 94 (2): 406–410.
- Genty, Bernard, Jean-Marie Briantais, and Neil R. Baker.** 1989. "The Relationship between the Quantum Yield of Photosynthetic Electron Transport and Quenching of Chlorophyll Fluorescence." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 990 (1): 87–92.
- Gill, Sarvajeet Singh, and Narendra Tuteja.** 2010. "Polyamines and Abiotic Stress Tolerance in Plants." *Plant Signaling & Behavior* 5 (1): 26–33.
- Godfray, H. Charles J., John R. Beddington, Ian R. Crute, Lawrence Haddad, David Lawrence, James F. Muir, Jules Pretty, Sherman Robinson, Sandy M. Thomas, and Camilla Toulmin.** 2010. "Food Security: The Challenge of Feeding 9 Billion People." *Science* 327 (5967): 812–818.
- Grando, S.** 1989. Breeding for Low Rainfall Areas. *Cereal Improvement Program Annual Report 1989*. Aleppo, Syria, ICARDA.
- Gregersen, Per L., Andrea Culetic, Luca Boschian, and Karin Krupinska.** 2013. "Plant Senescence and Crop Productivity." *Plant Molecular Biology* 82 (6): 603–622.
- Groppa, M. D., and M. P. Benavides.** 2008. "Polyamines and Abiotic Stress: Recent Advances." *Amino Acids* 34 (1): 35.
- Guo, Y., Z. Cai, and S. Gan.** 2004. "Transcriptome of Arabidopsis Leaf Senescence." *Plant, Cell & Environment* 27 (5): 521–549.
- Guo, Yongfeng, and Susheng Gan.** 2005. "Leaf Senescence: Signals, Execution, and Regulation." *Current Topics in Developmental Biology*, 71: 83–112.
- Guo, Peiguo, Michael Baum, Stefania Grando, Salvatore Ceccarelli, Guihua Bai, Ronghua Li, Maria von Korff, Rajeev K. Varshney, Andreas Graner, and Jan Valkoun.** 2009. "Differentially Expressed Genes between Drought-Tolerant and Drought-Sensitive Barley Genotypes in Response to Drought Stress during the Reproductive Stage." *Journal of Experimental Botany* 60 (12): 3531–3544.
- Gupta, Kamala, Abhijit Dey, and Bhaskar Gupta.** 2013. "Plant Polyamines in Abiotic Stress Responses." *Acta Physiologiae Plantarum* 35 (7): 2015–2036.
- Gyula, Péter, Eberhard Schäfer, and Ferenc Nagy.** 2003. "Light Perception and Signalling in Higher Plants." *Current Opinion in Plant Biology* 6 (5): 446–452.
- Ha, Sukbong, Radomira Vankova, Kazuko Yamaguchi-Shinozaki, Kazuo Shinozaki, and Lam-Son Phan Tran.** 2012. "Cytokinins: Metabolism and Function in Plant Adaptation to Environmental Stresses." *Trends in Plant Science* 17 (3): 172–179.

- Hanfrey, Colin, Marina Franceschetti, Melinda J. Mayer, Crista Illingworth, and Anthony J. Michael.** 2002. "Abrogation of Upstream Open Reading Frame-Mediated Translational Control of a Plant S-Adenosylmethionine Decarboxylase Results in Polyamine Disruption and Growth Perturbations." *Journal of Biological Chemistry* 277 (46): 44131–44139.
- Hatier, Jean-Hugues B., and Kevin S. Gould.** 2008. "Anthocyanin Function in Vegetative Organs." In *Anthocyanins*, Springer: 1–19.
- Havaux, Michel, and Florence Tardy.** 1999. "Loss of Chlorophyll with Limited Reduction of Photosynthesis as an Adaptive Response of Syrian Barley Landraces to High-Light and Heat Stress." *Functional Plant Biology* 26 (6): 569–578.
- Hong, Bimei, Rivka Barg, and Tuan-hua David Ho.** 1992. "Developmental and Organ-Specific Expression of an ABA- and Stress-Induced Protein in Barley." *Plant Molecular Biology* 18 (4): 663–674.
- Hu, Wen-Wei, Haibiao Gong, and Eng Chong Pua.** 2005. "The Pivotal Roles of the Plant S-Adenosylmethionine Decarboxylase 5' Untranslated Leader Sequence in Regulation of Gene Expression at the Transcriptional and Posttranscriptional Levels." *Plant Physiology* 138 (1): 276–286.
- Humbeck, K., S. Quast, and K. Krupinska.** 1996. "Functional and Molecular Changes in the Photosynthetic Apparatus during Senescence of Flag Leaves from Field-Grown Barley Plants." *Plant, Cell & Environment* 19 (3): 337–344.
- Humbeck, Klaus, and Karin Krupinska.** 2003. "The Abundance of Minor Chlorophyll a/b-Binding Proteins CP29 and LHCl of Barley (*Hordeum Vulgare* L.) during Leaf Senescence Is Controlled by Light." *Journal of Experimental Botany* 54 (381): 375–383.
- Hussain, Syed Sarfraz, Muhammad Ali, Maqbool Ahmad, and Kadambot H. M. Siddique.** 2011. "Polyamines: Natural and Engineered Abiotic and Biotic Stress Tolerance in Plants." *Biotechnology Advances* 29 (3): 300–311.
- Hwang, Ildoo, Jen Sheen, and Bruno Müller.** 2012. "Cytokinin Signaling Networks." *Annual Review of Plant Biology* 63 (1): 353–380.
- Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC).** 2015. "Climate Change 2014: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change [Core Writing Team, R.K. Pachauri and L.A. Meyer (eds.)]. IPCC, Geneva, Switzerland
- International Barley Genome Sequencing Consortium (IBSC).** 2012. "A Physical, Genetic and Functional Sequence Assembly of the Barley Genome." *Nature* 491 (7426): 711–716.
- Janack, Bianka, Paula Sosoi, Karin Krupinska, and Klaus Humbeck.** 2016. "Knockdown of WHIRLY1 Affects Drought Stress-Induced Leaf Senescence and Histone Modifications of the Senescence-Associated Gene HvS40." *Plants* 5 (3): 37
- Janská, Anna, Jan Hodek, Pavel Svoboda, Jiří Zámečník, Ilja Tom Prášil, Eva Vlasáková, Luigi Milella, and Jaroslava Ovesná.** 2013. "The Choice of Reference Gene Set for Assessing Gene Expression in Barley (*Hordeum Vulgare* L.) under Low Temperature and Drought Stress." *Molecular Genetics and Genomics* 288 (11): 639–649.

- Jin, Jinpu, Feng Tian, De-Chang Yang, Yu-Qi Meng, Lei Kong, Jingchu Luo, and Ge Gao. 2017. "PlantTFDB 4.0: Toward a Central Hub for Transcription Factors and Regulatory Interactions in Plants." *Nucleic Acids Research* 45 (D1): D1040–D1045.
- Jones, Matthew A., Michael F. Covington, Luciano DiTacchio, Christopher Vollmers, Satchidananda Panda, and Stacey L. Harmer. 2010. "Jumonji Domain Protein JMJD5 Functions in Both the Plant and Human Circadian Systems." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107 (50): 21623–21628
- Karami, Amin, Maryam Shahbazi, Vahid Niknam, Zahra Sadat Shobbar, Razieh Sarabadani Tafreshi, Raha Abedini, and Hasan Ebrahimzadeh Mabood. 2013. "Expression Analysis of Dehydrin Multigene Family across Tolerant and Susceptible Barley (*Hordeum Vulgare* L.) Genotypes in Response to Terminal Drought Stress." *Acta Physiologiae Plantarum* 35 (7): 2289–2297.
- Kasukabe, Yoshihisa, Lixiong He, Kazuyoshi Nada, Shuhei Misawa, Izumi Ihara, and Shoji Tachibana. 2004. "Overexpression of Spermidine Synthase Enhances Tolerance to Multiple Environmental Stresses and Up-Regulates the Expression of Various Stress-Regulated Genes in Transgenic Arabidopsis Thaliana." *Plant and Cell Physiology* 45 (6): 712–722.
- Kasukabe, Yoshihisa, Lixiong He, Yuriko Watakabe, Motoyasu Otani, Takiko Shimada, und Shoji Tachibana. 2006. „Improvement of environmental stress tolerance of sweet potato by introduction of genes for spermidine synthase“. *Plant Biotechnology* 23 (1): 75–83.
- Kohl, Stefan, Julien Hollmann, Alexander Erban, Joachim Kopka, David Riewe, Winfriede Weschke, and Hans Weber. 2015a. "Metabolic and Transcriptional Transitions in Barley Glumes Reveal a Role as Transitory Resource Buffers during Endosperm Filling." *Journal of Experimental Botany* 66 (5): 1397–1411.
- Korff, M. von, S. Grando, A. Del Greco, D. This, M. Baum, and S. Ceccarelli. 2008. "Quantitative Trait Loci Associated with Adaptation to Mediterranean Dryland Conditions in Barley." *Theoretical and Applied Genetics* 117 (5): 653–669.
- Kosová, Klára, Pavel Vítámvás, and Ilja T. Prášil. 2014. "Wheat and Barley Dehydrins under Cold, Drought, and Salinity – What Can LEA-II Proteins Tell Us about Plant Stress Response?" *Frontiers in Plant Science* 5 .
- Krannich, Christoph Tim, Lisa Maletzki, Christina Kurowsky, and Renate Horn. 2015. "Network Candidate Genes in Breeding for Drought Tolerant Crops." *International Journal of Molecular Sciences* 16 (7): 16378–16400.
- Krupinska, Karin, Dorothee Dähnhardt, Isabell Fischer-Kilbienski, Weronika Kucharewicz, Christian Scharrenberg, Mirl Trösch, and Friedrich Buck. 2014. "Identification of WHIRLY1 as a Factor Binding to the Promoter of the Stress- and Senescence-Associated Gene HvS40." *Journal of Plant Growth Regulation* 33 (1): 91–105.
- Krupinska, Karin, Kirsten Haussühl, Anke Schäfer, Tom A. W. van der Kooij, Gunhild Leckband, Horst Lörz, and Jon Falk. 2002. "A Novel Nucleus-Targeted Protein Is Expressed in Barley Leaves during Senescence and Pathogen Infection." *Plant Physiology* 130 (3): 1172–1180.
- Kusano, T., T. Berberich, C. Tateda, and Y. Takahashi. 2008. "Polyamines: Essential Factors for Growth and Survival." *Planta* 228 (3): 367–381.

- Lal, Shalini, Vibha Gulyani, and Paramjit Khurana.** 2008. "Overexpression of HVA1 Gene from Barley Generates Tolerance to Salinity and Water Stress in Transgenic Mulberry (*Morus Indica*)." *Transgenic Research* 17 (4): 651.
- Laloum, Tom, Stéphane De Mita, Pascal Gamas, Maël Baudin, and Andreas Niebel.** 2013. "CCAAT-Box Binding Transcription Factors in Plants: Y so Many?" *Trends in Plant Science* 18 (3): 157–166.
- Legnaioli, Tommaso, Juan Cuevas, and Paloma Mas.** 2009. "TOC1 Functions as a Molecular Switch Connecting the Circadian Clock with Plant Responses to Drought." *The EMBO Journal* 28 (23): 3745–3757.
- Lesk, Corey, Pedram Rowhani, and Navin Ramankutty.** 2016. "Influence of Extreme Weather Disasters on Global Crop Production." *Nature* 529 (7584): 84–87.
- Levitt, J.** 1980. *Responses of Plants to Environmental Stresses. Volume II. Water, Radiation, Salt, and Other Stresses.* Vol. Academic Press.
- Li, Rong-hua, Pei-guo Guo, Baum Michael, Grando Stefania, and Ceccarelli Salvatore.** 2006. "Evaluation of Chlorophyll Content and Fluorescence Parameters as Indicators of Drought Tolerance in Barley." *Agricultural Sciences in China* 5 (10): 751–757.
- Lim, Pyung Ok, Hyo Jung Kim, and Hong Gil Nam.** 2007. "Leaf Senescence." *Annual Review of Plant Biology* 58 (1): 115–136.
- Liu, Ji-Hong, Hiroyasu Kitashiba, Jing Wang, Yusuke Ban, and Takaya Moriguchi.** 2007. "Polyamines and Their Ability to Provide Environmental Stress Tolerance to Plants." *Plant Biotechnology* 24 (1): 117–126.
- Liu, Qiang, Mie Kasuga, Yoh Sakuma, Hiroshi Abe, Setsuko Miura, Kazuko Yamaguchi-Shinozaki, and Kazuo Shinozaki.** 1998. "Two Transcription Factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA Binding Domain Separate Two Cellular Signal Transduction Pathways in Drought- and Low-Temperature-Responsive Gene Expression, Respectively, in Arabidopsis." *The Plant Cell* 10 (8): 1391–1406.
- Livak, Kenneth J., and Thomas D. Schmittgen.** 2001. "Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method." *Methods* 25 (4): 402–408.
- Lu, Sheen X., Stephen M. Knowles, Candace J. Webb, R. Brandon Celaya, Chuah Cha, Jonathan P. Siu, and Elaine M. Tobin.** 2011. "The Jumonji C Domain-Containing Protein JM30 Regulates Period Length in the Arabidopsis Circadian Clock." *Plant Physiology* 155 (2): 906–915.
- Luo, Ming, Fu-Yu Hung, Songguang Yang, Xuncheng Liu, and Keqiang Wu.** 2014. "Histone Lysine Demethylases and Their Functions in Plants." *Plant Molecular Biology Reporter* 32 (2): 558–565.
- Maqbool, S., H. Zhong, Y. El-Maghraby, A. Ahmad, B. Chai, W. Wang, R. Sabzikar, and M. Sticklen.** 2002. "Competence of Oat (*Avena Sativa* L.) Shoot Apical Meristems for Integrative Transformation, Inherited Expression, and Osmotic Tolerance of Transgenic Lines Containing Hva1." *Theoretical and Applied Genetics* 105 (2–3): 201–208.
- Max-Planck-Institut für Pflanzenzüchtungsforschung.** 2014. „Kulturpflanzen“, THOMAS MIEDANER, Springer-Verlag, Köln.

- Mikulková, Pavlina, Ludmila Holková, M Hronková, Marek Klems, und Marta Bradacova.** 2009. "Efficiency of different laboratory methods for selection of drought tolerant barley genotypes." *Cereal Research Communications* 37: 277–280.
- Morgan, David M. L.** 1999. "Polyamines." *Molecular Biotechnology* 11 (3): 229–250.
- Morrell, Peter L., and Michael T. Clegg.** 2007. "Genetic Evidence for a Second Domestication of Barley (*Hordeum Vulgare*) East of the Fertile Crescent." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104 (9): 3289–3294.
- Moschou, Panagiotis N., Konstantinos A. Paschalidis, and Kalliopi A. Roubelakis-Angelakis.** 2008. "Plant Polyamine Catabolism." *Plant Signaling & Behavior* 3 (12): 1061–1066.
- Munné-Bosch, Sergi, and Leonor Alegre.** 2004. "Die and Let Live: Leaf Senescence Contributes to Plant Survival under Drought Stress." *Functional Plant Biology* 31 (3): 203–216.
- Nakabayashi, Ryo, Tetsuya Mori, and Kazuki Saito.** 2014. "Alternation of Flavonoid Accumulation under Drought Stress in Arabidopsis Thaliana." *Plant Signaling & Behavior* 9 (8).
- Nakashima, Kazuo, Hironori Takasaki, Junya Mizoi, Kazuo Shinozaki, and Kazuko Yamaguchi-Shinozaki.** 2012. "NAC Transcription Factors in Plant Abiotic Stress Responses." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms* 1819 (2): 97–103.
- Nakashima, Kazuo, and Kazuko Yamaguchi-Shinozaki.** 2013. "ABA Signaling in Stress-Response and Seed Development." *Plant Cell Reports* 32 (7): 959–970.
- Nakashima, Kazuo, Kazuko Yamaguchi-Shinozaki, and Kazuo Shinozaki.** 2014. "The Transcriptional Regulatory Network in the Drought Response and Its Crosstalk in Abiotic Stress Responses Including Drought, Cold, and Heat." *Plant Genetics and Genomics* 5: 170.
- Nambara, Eiji, and Annie Marion-Poll.** 2005. "Abscisic Acid Biosynthesis and Catabolism." *Annual Review of Plant Biology* 56 (1): 165–185.
- Newton, A. C., T. Akar, J. P. Baresel, P. J. Bebeli, E. Bettencourt, K. V. Bladenopoulos, J. H. Czembor, et al.** 2010. "Cereal Landraces for Sustainable Agriculture. A Review." *Agronomy for Sustainable Development* 30 (2): 237–269.
- Nguyen, Kien Huu, Chien Van Ha, Rie Nishiyama, Yasuko Watanabe, Marco Antonio Leyva-González, Yasunari Fujita, Uven Thi Tran, et al.** 2016. "Arabidopsis Type B Cytokinin Response Regulators ARR1, ARR10, and ARR12 Negatively Regulate Plant Responses to Drought." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113 (11): 3090–3095.
- Nishiyama, Rie, Yasuko Watanabe, Yasunari Fujita, Dung Tien Le, Mikiko Kojima, Tomás Werner, Radomira Vankova, et al.** 2011. "Analysis of Cytokinin Mutants and Regulation of Cytokinin Metabolic Genes Reveals Important Regulatory Roles of Cytokinins in Drought, Salt and Abscisic Acid Responses, and Abscisic Acid Biosynthesis." *The Plant Cell Online* 23 (6): 2169–2183.
- Noodén, Larry D., Juan J. Guiamét, and Isaac John.** 1997. "Senescence Mechanisms." *Physiologia Plantarum* 101 (4): 746–753.
- Nuruzzaman, Mohammed, Akhter Most Sharoni, and Shoshi Kikuchi.** 2013. "Roles of NAC Transcription Factors in the Regulation of Biotic and Abiotic Stress Responses in Plants." *Virology* 4: 248.

- Olsen, Addie Nina, Heidi A. Ernst, Leila Lo Leggio, and Karen Skriver.** 2005. "NAC Transcription Factors: Structurally Distinct, Functionally Diverse." *Trends in Plant Science* 10 (2): 79–87.
- Ozturk, Z. Neslihan, Valentina Talamé, Michael Deyholos, Christine B. Michalowski, David W. Galbraith, Nermin Gozukirmizi, Roberto Tuberosa, and Hans J. Bohnert.** 2002. "Monitoring Large-Scale Changes in Transcript Abundance in Drought- and Salt-Stressed Barley." *Plant Molecular Biology* 48 (5–6): 551–573.
- Panagiotidis, Christos A., Steven Artandi, Kathryn Calame, and Saul J. Silverstein.** 1995. "Polyamines Alter Sequence-Specific DNA-Protein Interactions." *Nucleic Acids Research* 23 (10): 1800–1809.
- Papaefthimiou, Dimitra, and Athanasios S. Tsiftaris.** 2011. "Significant Induction by Drought of HvPKDM7-1, a Gene Encoding a Jumonji-like Histone Demethylase Homologue in Barley (*H. Vulgare*)." *Acta Physiologiae Plantarum* 34 (3): 1187–1198.
- Peleg, Zvi, and Eduardo Blumwald.** 2011. "Hormone Balance and Abiotic Stress Tolerance in Crop Plants." *Current Opinion in Plant Biology* 14 (3): 290–295.
- Peremarti, Ariadna, Ludovic Bassie, Paul Christou, and Teresa Capell.** 2009. "Spermine Facilitates Recovery from Drought but Does Not Confer Drought Tolerance in Transgenic Rice Plants Expressing *Datura Stramonium* S-Adenosylmethionine Decarboxylase." *Plant Molecular Biology* 70 (3): 253–264.
- Peremarti, Ariadna, Ludovic Bassie, Changfu Zhu, Paul Christou, and Teresa Capell.** 2010. "Molecular Characterization of the Arginine Decarboxylase Gene Family in Rice." *Transgenic Research* 19 (5): 785–797.
- Pickering, R. A., S. Malyshev, G. Künzel, P. A. Johnston, V. Korzun, M. Menke, and I. Schubert.** 2000. "Locating Introgressions of *Hordeum Bulbosum* Chromatin within the *H. Vulgare* Genome." *Theoretical and Applied Genetics* 100 (1): 27–31.
- Pottosin, Igor, and Sergey Shabala.** 2014. "Polyamines Control of Cation Transport across Plant Membranes: Implications for Ion Homeostasis and Abiotic Stress Signaling." *Frontiers in Plant Science* 5.
- Pourabed, Ehsan, Farzan Ghane Golmohamadi, Peyman Soleymani Monfared, Seyed Morteza Razavi, and Zahra-Sadat Shobbar.** 2014. "Basic Leucine Zipper Family in Barley: Genome-Wide Characterization of Members and Expression Analysis." *Molecular Biotechnology* 57 (1): 12–26.
- Prabhavathi, Venkat Raman, and Manchikatla Venkat Rajam.** 2007. "Polyamine Accumulation in Transgenic Eggplant Enhances Tolerance to Multiple Abiotic Stresses and Fungal Resistance." *Plant Biotechnology* 24 (3): 273–282.
- Pysh, Leonard D., Joanna W. Wysocka-Diller, Christine Camilleri, David Bouchez, and Philip N. Benfey.** 1999. "The GRAS Gene Family in Arabidopsis: Sequence Characterization and Basic Expression Analysis of the SCARECROW-LIKE Genes." *The Plant Journal* 18 (1): 111–119.
- Ptushenko, V. V., O. S. Ptushenko, and A. N. Tikhonov.** 2014. "Chlorophyll Fluorescence Induction, Chlorophyll Content, and Chromaticity Characteristics of Leaves as Indicators of Photosynthetic Apparatus Senescence in Arboreous Plants." *Biochemistry (Moscow)*. 79 (3): 260–272.

- Rabara, Roel C., Prateek Tripathi, and Paul J. Rushton.** 2014. "The Potential of Transcription Factor-Based Genetic Engineering in Improving Crop Tolerance to Drought." *OMICS: A Journal of Integrative Biology* 18 (10): 601–614.
- Rangan, Parimalan, Rajkumar Subramani, Rajesh Kumar, Amit Kumar Singh, and Rakesh Singh.** 2014. "Recent Advances in Polyamine Metabolism and Abiotic Stress Tolerance." *BioMed Research International* 2014.
- Rivero, Rosa M., Mikiko Kojima, Amira Gepstein, Hitoshi Sakakibara, Ron Mittler, Shimon Gepstein, and Eduardo Blumwald.** 2007. "Delayed Leaf Senescence Induces Extreme Drought Tolerance in a Flowering Plant." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104 (49): 19631–19636.
- Rohila, Jai S, Rajinder K Jain, and Ray Wu.** 2002. "Genetic Improvement of Basmati Rice for Salt and Drought Tolerance by Regulated Expression of a Barley Hva1 CDNA." *Plant Science* 163 (3): 525–532.
- Salamini, Francesco, Hakan Ozkan, Andrea Brandolini, Ralf Schafer-Pregl, and William Martin.** 2002. "Genetics and Geography of Wild Cereal Domestication in the near East." *Nat Rev Genet* 3 (6): 429–441.
- Samarah, H. Nezar.** 2005. "Effects of Drought Stress on Growth and Yield of Barley." *Agronomy for Sustainable Development* 25 (1): 145–149.
- Schöffl, Fritz, Ralf Prändl, and Andreas Reindl.** 1998. "Regulation of the Heat-Shock Response." *Plant Physiology* 117 (4): 1135–1141.
- Schreiber, U., W. Bilger, and C. Neubauer.** 1995. "Chlorophyll Fluorescence as a Noninvasive Indicator for Rapid Assessment of In Vivo Photosynthesis." In *Ecophysiology of Photosynthesis*, edited by Professor Dr Ernst-Detlef Schulze and Professor Dr Martyn M. Caldwell, 49–70.
- Seiler, Christiane, Vokkaliga Thammegowda Harshavardhan, Kalladan Rajesh, Palakolanu Sudhakar Reddy, Marc Strickert, Hardy Rolletschek, Uwe Scholz, Ulrich Wobus, und Nese Sreenivasulu.** 2011. „ABA Biosynthesis and Degradation Contributing to ABA Homeostasis during Barley Seed Development under Control and Terminal Drought-Stress Conditions“. *Journal of Experimental Botany* 62 (8): 2615–2632.
- Seki, Motoaki, Taishi Umezawa, Kaoru Urano, and Kazuo Shinozaki.** 2007. "Regulatory Metabolic Networks in Drought Stress Responses." *Current Opinion in Plant Biology* 10 (3): 296–302.
- Shin, Dong Ho, MyungGoo Choi, Keunhwa Kim, Geul Bang, Misuk Cho, Sang-Bong Choi, Giltso Choi, and Youn-Il Park.** 2013. "HY5 Regulates Anthocyanin Biosynthesis by Inducing the Transcriptional Activation of the MYB75/PAP1 Transcription Factor in Arabidopsis." *FEBS Letters* 587 (10): 1543–1547.
- Shinozaki, Kazuo, and Kazuko Yamaguchi-Shinozaki.** 2007. "Gene Networks Involved in Drought Stress Response and Tolerance." *Journal of Experimental Botany* 58 (2): 221–227.
- Shiu, S. H., and A. B. Bleecker.** 2001. "Plant Receptor-like Kinase Gene Family: Diversity, Function, and Signaling." *Science's STKE: Signal Transduction Knowledge Environment* 2001 (113): 22.
- Singh, Dhriti, and Ashverya Laxmi.** 2015. "Transcriptional Regulation of Drought Response: A Tortuous Network of Transcriptional Factors." *Plant Physiology*, 895.

- Sivamani, Elumalai, Ahmed Bahieldin, Jon M Wraith, Thamir Al-Niemi, William E Dyer, Tuan-Hua David Ho, and Rongda Qu.** 2000. "Improved Biomass Productivity and Water Use Efficiency under Water Deficit Conditions in Transgenic Wheat Constitutively Expressing the Barley HVA1 Gene." *Plant Science* 155 (1): 1–9.
- Sreenivasulu, Nese, Andreas Graner, and Ulrich Wobus.** 2008. "Barley Genomics: An Overview." *International Journal of Plant Genomics* 2008
- Suprunova, T., T. Krugman, T. Fahima, G. Chen, I. Shams, A. Korol, and E. Nevo.** 2004. "Differential Expression of Dehydrin Genes in Wild Barley, *Hordeum Spontaneum*, Associated with Resistance to Water Deficit." *Plant, Cell & Environment* 27 (10): 1297–1308.
- Svoboda, Pavel, Anna Janská, Vojtěch Spiwok, Ilja T. Prášil, Klára Kosová, Pavel Vítámvás, and Jaroslava Ovesná.** 2016. "Global Scale Transcriptional Profiling of Two Contrasting Barley Genotypes Exposed to Moderate Drought Conditions: Contribution of Leaves and Crowns to Water Shortage Coping Strategies." *Frontiers in Plant Science* 7
- Talamè, Valentina, Neslihan Z. Ozturk, Hans J. Bohnert, and Roberto Tuberosa.** 2007. "Barley Transcript Profiles under Dehydration Shock and Drought Stress Treatments: A Comparative Analysis." *Journal of Experimental Botany* 58 (2): 229–240.
- Tardy, F., A. Créach, and M. Havaux.** 1998. "Photosynthetic Pigment Concentration, Organization and Interconversions in a Pale Green Syrian Landrace of Barley (*Hordeum Vulgare* L., Tadmor) Adapted to Harsh Climatic Conditions." *Plant, Cell & Environment* 21 (5): 479–489.
- Tester, Mark, and Peter Langridge.** 2010. "Breeding Technologies to Increase Crop Production in a Changing World." *Science* 327 (5967): 818–822.
- Teulat, B., P. Monneveux, J. Wery, C. Borries, I. Souyris, A. Charrier, and D. This.** 1997. "Relationships between Relative Water Content and Growth Parameters under Water Stress in Barley: A QTL Study." *New Phytologist* 137 (1): 99–107.
- Teulat, B., C. Borries, and D. This.** 2001. "New QTLs Identified for Plant Water Status, Water-Soluble Carbohydrate and Osmotic Adjustment in a Barley Population Grown in a Growth-Chamber under Two Water Regimes." *Theoretical and Applied Genetics* 103 (1): 161–170.
- Thimm, Oliver, Oliver Bläsing, Yves Gibon, Axel Nagel, Svenja Meyer, Peter Krüger, Joachim Selbig, Lukas A. Müller, Seung Y. Rhee, and Mark Stitt.** 2004. "MAPMAN: A User-Driven Tool to Display Genomics Data Sets onto Diagrams of Metabolic Pathways and Other Biological Processes." *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology* 37 (6): 914–939.
- Tian, Chaoguang, Ping Wan, Shouhong Sun, Jiayang Li, and Mingsheng Chen.** 2004. "Genome-Wide Analysis of the GRAS Gene Family in Rice and Arabidopsis." *Plant Molecular Biology* 54 (4): 519–532.
- Tian, F. X., M. Zhang, X. Wang, Y. H. Chen, and W. Wang.** 2015. "Antioxidative Defence under Drought Stress in a Wheat Stay-Green Mutant." *Biologia Plantarum* 59 (1): 123–130.
- Tommasini, Livia, Jan T. Svensson, Edmundo M. Rodriguez, Abdul Wahid, Marina Malatrasi, Kenji Kato, Steve Wanamaker, Josh Resnik, and Timothy J. Close.** 2008. "Dehydrin Gene Expression Provides an Indicator of Low Temperature and Drought Stress: Transcriptome-Based Analysis of Barley (*Hordeum Vulgare* L.)." *Functional & Integrative Genomics* 8 (4): 387–405.

- Tondelli, A., E. Francia, D. Barabaschi, A. Aprile, J. S. Skinner, E. J. Stockinger, A. M. Stanca, and N. Pecchioni.** 2006. "Mapping Regulatory Genes as Candidates for Cold and Drought Stress Tolerance in Barley." *Theoretical and Applied Genetics* 112 (3): 445–454.
- Tran, Lam-Son Phan, Kazuo Nakashima, Yoh Sakuma, Yuriko Osakabe, Feng Qin, Sean D. Simpson, Kyonoshin Maruyama, Yasunari Fujita, Kazuo Shinozaki, and Kazuko Yamaguchi-Shinozaki.** 2007. "Co-Expression of the Stress-Inducible Zinc Finger Homeodomain ZFHD1 and NAC Transcription Factors Enhances Expression of the ERD1 Gene in Arabidopsis." *The Plant Journal* 49 (1): 46–63.
- Tunnacliffe, Alan, and Michael J. Wise.** 2007. "The Continuing Conundrum of the LEA Proteins." *Naturwissenschaften* 94 (10): 791–812.
- Tuteja, Narendra, and Sudhir K. Sopory.** 2008. "Chemical Signaling under Abiotic Stress Environment in Plants." *Plant Signaling & Behavior* 3 (8): 525–536.
- Udvardi, Michael K., Klementina Kakar, Maren Wandrey, Ombretta Montanari, Jeremy Murray, Andry Andriankaja, Ji-Yi Zhang, et al.** 2007. "Legume Transcription Factors: Global Regulators of Plant Development and Response to the Environment." *Plant Physiology* 144 (2): 538–549.
- Umezawa, Taishi, Miki Fujita, Yasunari Fujita, Kazuko Yamaguchi-Shinozaki, and Kazuo Shinozaki.** 2006. "Engineering Drought Tolerance in Plants: Discovering and Tailoring Genes to Unlock the Future." *Current Opinion in Biotechnology, Plant biotechnology/Food biotechnology* 17 (2): 113–122.
- Usadel, Björn, Axel Nagel, Oliver Thimm, Henning Redestig, Oliver E. Blaesing, Natalia Palacios-Rojas, Joachim Selbig, et al.** 2005. "Extension of the Visualization Tool MapMan to Allow Statistical Analysis of Arrays, Display of Corresponding Genes, and Comparison with Known Responses." *Plant Physiology* 138 (3): 1195–1204.
- Usadel, Björn, Axel Nagel, Dirk Steinhauser, Yves Gibon, Oliver E. Bläsing, Henning Redestig, Nese Sreenivasulu, et al.** 2006. "PageMan: An Interactive Ontology Tool to Generate, Display, and Annotate Overview Graphs for Profiling Experiments." *BMC Bioinformatics* 7 (1): 535.
- Vandenbroucke, Korneel, Steven Robbens, Klaas Vandepoele, Dirk Inzé, Yves Van de Peer, and Frank Van Breusegem.** 2008. "Hydrogen Peroxide-Induced Gene Expression across Kingdoms: A Comparative Analysis." *Molecular Biology and Evolution* 25 (3): 507–516.
- Volaire, Florence.** 2003. "Seedling Survival under Drought Differs between an Annual (*Hordeum Vulgare*) and a Perennial Grass (*Dactylis Glomerata*)." *New Phytologist* 160 (3): 501–510.
- Wang, Wangxia, Basia Vinocur, Oded Shoseyov, and Arie Altman.** 2004. "Role of Plant Heat-Shock Proteins and Molecular Chaperones in the Abiotic Stress Response." *Trends in Plant Science* 9 (5): 244–252.
- Wang, Bao-Quan, Qing-Fu Zhang, Ji-Hong Liu, and Guo-Huai Li.** 2011. "Overexpression of PtADC Confers Enhanced Dehydration and Drought Tolerance in Transgenic Tobacco and Tomato: Effect on ROS Elimination." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 413 (1): 10–16.
- Waie, Bhavna, and Manchikatla Venkat Rajam.** 2003. "Effect of Increased Polyamine Biosynthesis on Stress Responses in Transgenic Tobacco by Introduction of Human S-Adenosylmethionine Gene." *Plant Science* 164 (5): 727–734.

- Weltzien, Eva.** 1988. "Evaluation of Barley (*Hordeum Vulgare* L.) Landrace Populations Originating from Different Growing Regions in the Near East*." *Plant Breeding* 101 (2): 95–106.
- Wickramasuriya, Anushka M., and Jim M. Dunwell.** 2015. "Global Scale Transcriptome Analysis of Arabidopsis Embryogenesis in Vitro." *BMC Genomics* 16: 301.
- Xiao, Benze, Yuemin Huang, Ning Tang, and Lizhong Xiong.** 2007. "Over-Expression of a LEA Gene in Rice Improves Drought Resistance under the Field Conditions." *Theoretical and Applied Genetics* 115 (1): 35–46.
- Xu, D., X. Duan, B. Wang, B. Hong, Thd Ho, and R. Wu.** 1996. "Expression of a Late Embryogenesis Abundant Protein Gene, HVA1, from Barley Confers Tolerance to Water Deficit and Salt Stress in Transgenic Rice." *Plant Physiology* 110 (1): 249–257.
- Xu, Zhenzhu, Guangsheng Zhou, and Hideyuki Shimizu.** 2010. "Plant Responses to Drought and Rewatering." *Plant Signaling & Behavior* 5 (6): 649–654.
- Xu, Kai, Shoujun Chen, Tianfei Li, Xiaosong Ma, Xiaohua Liang, Xuefeng Ding, Hongyan Liu, and Lijun Luo.** 2015. "OsGRAS23, a Rice GRAS Transcription Factor Gene, Is Involved in Drought Stress Response through Regulating Expression of Stress-Responsive Genes." *BMC Plant Biology* 15: 141.
- Yamaguchi, Koji, Yoshihiro Takahashi, Thomas Berberich, Akihiko Imai, Taku Takahashi, Anthony J. Michael, and Tomonobu Kusano.** 2007. "A Protective Role for the Polyamine Spermine against Drought Stress in Arabidopsis." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 352 (2): 486–490.
- Yamaguchi-Shinozaki, Kazuko, and Kazuo Shinozaki.** 2006. "Transcriptional Regulatory Networks in Cellular Responses and Tolerance to Dehydration and Cold Stresses." *Annual Review of Plant Biology* 57 (1): 781–803.
- Yang, Jianchang, Jianhua Zhang, Kai Liu, Zhiqin Wang, and Lijun Liu.** 2007. "Involvement of Polyamines in the Drought Resistance of Rice." *Journal of Experimental Botany* 58 (6): 1545–1555.
- Young, Todd E., Robert B. Meeley, and Daniel R. Gallie.** 2004. "ACC Synthase Expression Regulates Leaf Performance and Drought Tolerance in Maize." *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology* 40 (5): 813–825.
- Zhang, Jianhua, Wensuo Jia, Jianchang Yang, and Abdelbagi M. Ismail.** 2006. "Role of ABA in Integrating Plant Responses to Drought and Salt Stresses." *Field Crops Research* 97 (1): 111–119.
- Zohary, Daniel, Maria Hopf, and Ehud Weiss.** 2012. *Domestication of Plants in the Old World: The Origin and Spread of Domesticated Plants in Southwest Asia, Europe, and the Mediterranean Basin.* OUP Oxford.
- Zwack, Paul J., and Aaron M. Rashotte.** 2015. "Interactions between Cytokinin Signalling and Abiotic Stress Responses." *Journal of Experimental Botany* 66 (16): 4863–4871.

VIII Abkürzungsverzeichnis

2n	diploid
$2^{-\Delta\Delta Ct}$	Relatives Expressionslevel
ABA	Abscisinsäure
Acc. No.	<i>Accession Number</i> laut GenBank®
AG	Arbeitsgruppe
At	<i>Arabidopsis thaliana</i>
BIN	Haupt-Gengruppe, funktionelle Kategorie (MAPMAN)
bp	Basenpaare
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
bzw.	beziehungsweise
c	Konzentration
°C	Grad Celsius
ca.	circa
Ca ²⁺	Calcium-Ionen
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CBF	<i>C-Repeat Binding Factor</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
cRNA	<i>complimentary RNA</i>
Ct	<i>crossing threshold / cycles to threshold</i>
cv.	cultivarietas = Kulturvarietät
DAG	Diacylglycerin
das	<i>days after sowing</i>
DEPC	Diethylen Pyrocarbonat
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid / Desoxyribonukleinsäure</i>
DNAse	Deoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DRE	<i>dehydration-responsive element</i>
DREB	<i>DRE-binding protein</i>
DRG	<i>differenziell regulated genes / differenziell regulierte Gene</i>
E	Extinktion
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
<i>et al.</i>	lat. „und andere“
EtOH	Ethanol
F ₀	Grundfluoreszenz
FAO	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>
FC	<i>Fold Change</i> , Vielfaches
F _M	maximale Fluoreszenz
F _V	variable Fluoreszenz
g	Gramm
h	Stunde
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HSP	<i>heat-shock protein</i> , Genfamilie (Transkriptionsfaktoren)
Hv	<i>Hordeum vulgare</i>
IBSC	<i>International Barley Genome Sequencing Consortium</i>
ICARDA	<i>International Center for Agricultural Research in the Dry Areas</i>
IAEW	Institut für Agrar- und Ernährungswissenschaften
IL	<i>introgression line / Introgressionslinie</i>
IP ₃	Inositol-1,4,5-triphosphat
IPK	Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung
IPPC	<i>Intergovernmental Panel on Climate Change</i>

L.	„Linné“
LEA	<i>late embryogenesis abundant</i>
log	Logarithmus
M	Molar
MAP	<i>mitogen activated protein</i>
M-MuLVRT (H-)	<i>Moloney murine leukemia virus RNase H minus-reverse transcriptase</i>
MPI	Max-Planck-Institut
Mrd.	Milliarde
mRNA	<i>messenger RNA</i>
n	biologisches Replikat
NAC	<i>NAM, ATAF, CUC</i> , Genfamilie (Transkriptionsfaktoren)
nm	Nanometer
ORA	<i>overrepresentation analyses</i> / Überrepräsentations-Analyse
PA	Polyamin
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
pH	pH-Wert
PSII	Photosystem II
p-value	<i>probability value</i> , Signifikanzwert
R	Pearson-Korrelationskoeffizient
Ref	<i>Reference</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i> / Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
ROS	<i>reactive oxygen species</i> / reaktive Sauerstoffspezies
qRT-PCR	Quantitative Real-Time PCR
rpm	<i>rounds per minute</i> ; Umdrehungen pro Minute
rRNA	ribosomale RNA
rSWC	<i>relative soil water content</i>
RT	Raumtemperatur
qRT-PCR	<i>quantitative realtime PCR</i>
SAG	<i>senescence-associated genes</i>
SDG	<i>senescence down-regulated genes</i>
SPAD	<i>Soil Plant Analysis Development</i>
subBIN	Gengruppe, funktionelle Kategorie (MAPMAN)
T _a	annealing-Temperatur
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TAIR10	<i>The Arabidopsis Information Resource</i> , Datenbank für Annotation in <i>Arabidopsis thaliana</i>
TargetID	Identifikationsnummer auf dem Microarray
TF	Transkriptionsfaktor
T _m	Schmelztemperatur
TR	Transkriptionsregulator
U	Unit
u. a.	unter anderem
UV	ultraviolett
v/v	volume per volume
WRKY	Genfamilie (Transkriptionsfaktoren)
w/v	weight per volume
x g	Einheit der Erdbeschleunigung
z.B.	zum Beispiel

Bemerkung:

Englische Termini und Anglizismen wurden als solche beibehalten und kursiv markiert.

IX Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2.1	Herkunfts- (rot)- und Anbauggebiete (grün) der Gerste.....	6
Abbildung 2.2	Genpools der Gattung <i>Hordeum</i>	7
Abbildung 2.3	Regulatorisches Netzwerk der wichtigsten TF der Trockenstress-Antwort.	13
Abbildung 2.4	Polyamin-Metabolismus.....	15
Abbildung 4.1	Bildliche Dokumentation phänotypischer Unterschiede zwischen Tadmor und Scarlett im zeitlichen Verlauf des Trockenstress-Experiments.	19
Abbildung 4.2	(A) PSII-Effizienz (F_v/F_m) und (B) relativer Chlorophyllgehalt (SPAD-Werte) in Abhängigkeit des zeitlichen Verlaufs des Trockenstress-Experiments (T1-T8) für Scarlett und Tadmor.....	20
Abbildung 4.3	Relativer Chlorophyllgehalt (SPAD-Werte) ausgewachsener Primärblätter von Scarlett und Tadmor unter Kontrollbedingungen.....	21
Abbildung 4.4	Relatives Expressionslevel ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) der Marker-Gene <i>HvS40</i> [AJ310379], <i>Hva1</i> [X78205], <i>HvDhn1</i> [AF043087] und <i>HvHsp17</i> [YO7844] unter Trockenstress in Scarlett und Tadmor.	22
Abbildung 4.5	Übersicht aller differentiell regulierten Gene (DRG) in Scarlett und Tadmor im zeitlichen Verlauf des Trockenstress-Experiments.....	24
Abbildung 4.6	A) Anzahl der DRG in den einzelnen BINs unter Trockenstressbedingungen (T1, T2, T3) in Scarlett (rechts) und in Tadmor (links). B) Verteilung aller auf dem Microarray (Agilent 60K-barley) annotierten Gene in BINs.....	26
Abbildung 4.7	<i>Overrepresentation analysis</i> (ORA) der DRG in Scarlett und Tadmor im Verlauf des Trockenstressexperiments.....	28
Abbildung 4.8	Übersicht aller differentiell regulierter TR in Scarlett und Tadmor im zeitlichen Verlauf des Trockenstress-Experiments.....	32
Abbildung 4.9	Cluster-Analyse von 869 identifizierten TR zu den einzelnen Stadien des Trockenstress-Experiments für Scarlett (links) und Tadmor (rechts).	34
Abbildung 4.10	Relatives Expressionslevel ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) der Kandidaten-Gene A) <i>Jumonji</i> (AK372811) und B) <i>unbekannter TR</i> (AK362981) unter Trockenstress in Scarlett und Tadmor.....	38
Abbildung 4.11	Relatives Expressionslevel ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) der Kandidaten-Gene A) <i>bZIP</i> (AK375694) und B) <i>GRAS</i> (AK357996) unter Trockenstress in Scarlett und Tadmor.	40
Abbildung 4.12	Relatives Expressionslevel ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) der Kandidaten-Gene A) <i>AP2/EREBP</i> (DQ445244) und B) <i>unbekannter TR</i> (AK369809) unter Trockenstress in Scarlett und Tadmor.....	41

Abbildung 4.13	Relatives Expressionslevel ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) der Kandidaten-Gene <i>MYB-related</i> (AK376021) und <i>AP2/EREBP</i> (AK362109) unter Trockenstress in Scarlett und Tadmor.	43
Abbildung 4.14	Relatives Expressionslevel ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) der Polyamin-Stoffwechsel Gene <i>HvADC</i> [AK376935] (A), <i>HvSAMDC</i> [AK365592] (B), <i>HvSAMDC</i> [AK252992] (C), <i>HvSPDS</i> [AK376906] (D) <i>HvSPDS</i> [AK250159] (E) und <i>HvSPMS</i> [AK362530] (F) in Scarlett und Tadmor.	45
Abbildung 4.15	Relatives Expressionslevel ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) der Polyamin-Stoffwechsel Gene <i>HvPAO1</i> [AJ298131] (A) und <i>HvPAO2</i> [AJ298132] (B) in Scarlett und Tadmor.	46
Abbildung 4.16	Korrelation zwischen Microarray- und qRT-PCR-Daten.	47
Abbildung 6.1	Berechnung der PSII-Effizienz	66
Abbildung 6.2	Berechnung der DNA-Konzentration	68
Abbildung 6.3	Berechnung der PCR-Effizienz (E)	73
Abbildung 6.4	Berechnung des relativen Expressionslevels	73
Abbildung 6.5	Probenset für die Microarray-Analysen (K – Kontrolle, T – Trockenstress)	74

X Tabellenverzeichnis

Tabelle 4.1	<i>Hordeum</i> Kultivare zur Analyse der trockenstress-induzierten Blattseneszenz.	17
Tabelle 4.2	Aufteilung aller induzierten (\uparrow , \log_2FC -Wert ≥ 2) und reprimierten (\downarrow , \log_2FC -Wert ≤ -2) DRGs in Scarlett und Tadmor unter Trockenstress (T1, T2, T3) im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle K1 und in Tadmor im Vergleich zu Scarlett (T vs. S) unter Kontrollbedingungen (K1).....	29 ff.
Tabelle 4.3	Definition und Einteilung der Cluster.	33
Tabelle 4.4	<i>Overrepresentation analysis</i> (ORA) der TR-Familien der Cluster 1-8.	36
Tabelle 4.5	Kandidaten-Gene (TR) Cluster 1 (n=53).....	37
Tabelle 4.6	Kandidaten-Gene (TR) Cluster 2 (n=62) und Cluster 3 (n=15)	39
Tabelle 4.7	Kandidaten-Gene (TR) für Cluster 4 (n=422).....	41
Tabelle 4.8	Kandidaten-Gene (TR) für Cluster 5 und Cluster 6	42
Tabelle 4.9	Gene des Polyamin-Stoffwechsels (Synthese-oben, Degradation-unten).	44
Tabelle 6.1	Übersicht der untersuchten <i>Hordeum vulgare</i> Kultivare unter Trockenstressbedingungen. ...	60
Tabelle 6.2	Oligonukleotide und Nukleotidsequenz	63 ff.
Tabelle 6.3	DNaseI-Verdau Ansatz ($\Sigma = 29,95\mu\text{l}$)	69
Tabelle 6.4	Programm: DNaseI-Verdau	69
Tabelle 6.5	cDNA-Synthese Ansatz ($\Sigma = 20\mu\text{l}$)	70
Tabelle 6.6	Programm: cDNA-Synthese	70
Tabelle 6.7	qRT-PCR Ansatz ($\Sigma = 10\mu\text{l}$)	72
Tabelle 6.8	Programm: qRT-PCR (T_m – Schmelztemperatur)	72

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich mich mit der vorliegenden Arbeit erstmals um die Erlangung des Doktorgrades bewerbe. Weiterhin erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel „Die Analyse der trockenstress-induzierten Blattseneszenz unter Nutzung verschiedener *Hordeum vulgare* Kultivare“ selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Zwickau, 16. Mai 2018

Sandra Böhme

Lebenslauf

Persönliche Daten

Familienname	Böhme, geb. Morgenroth
akademischer Grad	Diplom-Biologin
Vorname	Sandra
Geburtsdatum	02.04.1986
Geburtsort	Greiz
Wohnsitz	Liebigstraße 10, 08056 Zwickau
Staatsangehörigkeit	deutsch

Bildungsgang

2016-2017	Sächsische Bildungsagentur, Chemnitz schulpraktische Ausbildung Abschluss: Lehrbefähigung im Fach Biologie
2014-2015	Elternzeit
2010-2014	Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg Institut für Pflanzenphysiologie Promotion
2004-2010	Martin- Luther- Universität Halle-Wittenberg Studium Biologie Abschluss: Diplom
1996-2004	Staatliches Gymnasium, Greiz Abschluss: Abitur
1992-1996	Staatl. Grundschule „Gotthold Ephraim Lessing“, Greiz

Zwickau, den 16. Mai 2018 Sandra Böhme