

Der Einfluss des Polyamins Spermin auf Calciumsignale und Reaktionen auf Trockenstress bei Gerste

Dissertation

zur Erlangung des
Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät III – Agrar- und
Ernährungswissenschaften, Geowissenschaften und Informatik

der Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg,

vorgelegt

von Frau Nancy Zimmermann

geb. am 28.12.1979 in Halle/Saale

Halle/Saale 06.07.2020

Gutachter:

1. Prof. Edgar Peiter
2. Prof. Christian Zörb

Zusammenfassung

Schlagwörter: Trockenstress, Polyamine, Ca²⁺-Signale, Gerste, *Hordeum vulgare*

Weltweit zählt Trockenstress zu den wichtigsten ertragslimitierenden Faktoren der Gerste, die mit einer Anbaufläche von rund 49 Millionen ha nach Weizen, Mais und Reis global zu den wichtigsten Nutzpflanzen zählt. Trockenstressresistente Genotypen sind daher von großer Bedeutung, insbesondere da ein großer Teil der Anbauflächen in semiariden beziehungsweise ariden Gebieten, wie beispielsweise im mittleren Westen Amerikas und in Zentralasien, zu finden ist. Polyamine, wie Spermin und Spermidin, spielen im Zusammenhang mit einer verbesserten Toleranz gegenüber Trockenstress eine zentrale Rolle. Anhand der Gerste (*Hordeum vulgare*) sollte daher der Einfluss des Polyamins Spermin im Hinblick auf die Vermittlung von Trockenstresstoleranz untersucht werden. Da Polyamine zum Schließen von Stomata führen, stand dabei die Untersuchung der Regulation von Schließzellen im Vordergrund. Die Wirkung extern applizierten Spermis war konzentrationsabhängig und reversibel. Inhibitoren der Polyaminoxidase (PAO) und Fänger von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), wie beispielsweise Guazatinacetat und Ascorbinsäure, verhinderten den Prozess des Stomataschlusses. Dies deutete darauf hin, dass Spermin entweder direkt oder indirekt die Bildung von H₂O₂ oder anderer reaktiver Sauerstoffspezies beeinflusst oder zur Veränderung von Ca²⁺-permeablen Kanälen führt. Basierend auf Ergebnissen aus elektrophysiologischen Versuchen mit pflanzlichen Ionenkanälen, wurde die Hypothese aufgestellt, dass Spermin möglicherweise die freie zytosolische Ca²⁺-Konzentration ([Ca²⁺]_{cyt}) verändert und damit indirekt über den sekundären Botenstoff Ca²⁺ als Regulator von K⁺-Kanälen in Schließzellen agiert. Dies könnte wiederum einen Einfluss auf die Trockenstresstoleranz von Gerste haben. Daher wurde die Auswirkung von Polyaminen auf die [Ca²⁺]_{cyt} untersucht. Diese Arbeiten wurden an der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* durchgeführt, da [Ca²⁺]_{cyt}-Reporterlinien vorlagen und in dieser Pflanze Mechanismen der Ca²⁺-Signalwege bereits bekannt sind. Die Ca²⁺-Reporterproteine Aequorin und Yellow Cameleon wurden genutzt, um [Ca²⁺]_{cyt} in Ganzpflanzen, in Pflanzenteilen und in einzelnen Schließzellen zu analysieren. In Ganzpflanzen konnten nach einer Behandlung mit Spermin biphasische Veränderungen der [Ca²⁺]_{cyt} beobachtet werden. Dabei konnten [Ca²⁺]_{cyt} Veränderungen sowohl im Spross als auch in der Wurzel nachgewiesen werden. In Schließzellen, die Spermin ausgesetzt waren, zeigten sich dagegen Veränderungen der [Ca²⁺]_{cyt} in Form von Ca²⁺-Oszillationen. Auf Basis dieser Ergebnisse wird postuliert, dass Spermin an Veränderungen der [Ca²⁺]_{cyt} beteiligt ist und auf diesem Weg einen entscheidenden Einfluss auf die Trockenstresstoleranz von Pflanzen hat.

Zur weiteren Aufklärung der Rolle von Spermin wurden zwei putative Sperminsynthasen (*HvSPMS1* und *HvSPMS2*) und eine Spermidinsynthase (*HvSPDS*) in Gerste identifiziert. Ergebnisse von Expressionsanalysen deuten darauf hin, dass vor allem die Sperminsynthasen an der Trockenstresstoleranz beteiligt sind. Um deren Rolle *in vivo* zu untersuchen, wurden diese Gene kloniert, und es wurden transgene Gerstelinien erzeugt, in denen diese überexprimiert oder mittels RNAi herunterreguliert sind. Diese Linien stellen die Basis für weiterführende Arbeiten dar.

Summary

Keywords: drought stress, polyamines, Ca²⁺ signals, barley, *Hordeum vulgare*

Drought stress is one of the most important factors limiting the yield of barley worldwide, which, after wheat, maize and rice, is one of the world's most important crops with around 49 million hectares. Drought-resistant genotypes are therefore of great importance, especially as much of the land is found in semi-arid and arid areas, such as the Midwest and Central Asia. Polyamines, especially spermine and spermidine, play a central role in the context of improved tolerance to drought stress. The aim of this work was therefore to investigate the involvement of the polyamine spermine in drought stress tolerance of barley (*Hordeum vulgare*). Since polyamines cause the closure of the stomata, the study focused on the regulation of guard cells. The effect of externally applied spermine was concentration-dependent and reversible. Inhibitors of polyamine oxidase (PAO) and reactive oxygen species scavengers (ROS), such as guazatine acetate and ascorbic acid, respectively, prevented the process of stomatal closure. This suggested that spermine influences, either directly or indirectly, the formation of H₂O₂ and other reactive oxygen species or that it may modulate Ca²⁺-permeable channels. Based on results from electrophysiological experiments on plant ion channels, it was hypothesized that spermine may alter the free cytosolic Ca²⁺ concentration ([Ca²⁺]_{cyt}) and thus act indirectly via the second messenger Ca²⁺ as a regulator of K⁺ channels in guard cells. This in turn could have an impact on drought stress tolerance of barley. Therefore, the effect of polyamines on [Ca²⁺]_{cyt} was investigated. This work was carried out on the model plant *Arabidopsis thaliana*, since there were [Ca²⁺]_{cyt} reporter lines available, and in this plant mechanisms of Ca²⁺ signaling are already known. The Ca²⁺ reporter proteins aequorin and yellow cameleon were used to analyze [Ca²⁺]_{cyt} in whole plants, in plant parts, and in individual guard cells. In whole plants, biphasic changes of [Ca²⁺]_{cyt} were observed after treatment with spermine. In this case [Ca²⁺]_{cyt} changes were detected both in the shoot and in the root. However, in guard cells exposed to spermine, changes in [Ca²⁺]_{cyt} were observed in the form of Ca²⁺ oscillations. On the basis of these results, it is postulated that spermine is involved in alterations of [Ca²⁺]_{cyt} and in this way has a decisive influence on the drought tolerance of plants.

In this work, two putative spermine synthases (*HvSPMS1* and *HvSPMS2*) and one spermidine synthase (*HvSPDS*) were identified to further clarify the role of polyamines in barley. Results of expression analyses suggest that the spermine synthases in particular are involved in drought stress tolerance. To study their role *in vivo*, the genes were cloned, and transgenic barley lines were produced in which they were

overexpressed or down-regulated by RNAi. These lines are the basis for further investigations.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	1
Summary.....	3
Inhaltsverzeichnis	5
Abbildungsverzeichnis	8
Tabellenverzeichnis	10
Abkürzungsverzeichnis	11
1 Einleitung.....	13
1.1 Gerstenpflanzen unter Stress	13
1.2 Trockenstressresistenz und Schließzellregulation	17
1.3 Die Rolle von Calcium in Pflanzen.....	19
1.4 Generierung von zytosolischen Calciumsignalen.....	20
1.5 Vorkommen und Biosynthese von Polyaminen.....	22
1.6 Die Rolle von Spermin in der Stresstoleranz von Pflanzen	26
1.7 Spermysynthese als Produzent von Spermin in Pflanzen.....	27
1.8 Hypothesen und Ziele dieser Arbeit.....	29
2 Material und Methoden	31
2.1 Software und Datenbanken	31
2.2 Materialien.....	32
2.2.1 Chemikalien, Enzyme und Kits	32
2.2.2 Oligonukleotide.....	32
2.2.3 Pflanzen	32
2.3 Anzuchtmethoden	32
2.3.1 Bakterienanzucht.....	32
2.3.2 Anzucht von <i>Arabidopsis thaliana</i> auf Erde	33
2.3.3 Anzucht von <i>Arabidopsis thaliana</i> in Hydrokultur	33
2.3.4 Anzucht von <i>Hordeum vulgare</i> auf Erde	33
2.3.5 Anzucht von <i>Hordeum vulgare</i> in Hydrokultur.....	34
2.4 Molekularbiologische Methoden	34
2.4.1 RNA-Extraktion.....	34
2.4.2 Reverse Transkription	35
2.4.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	35
2.4.4 Agarose-Gelelektrophorese.....	36
2.4.5 Isolierung und Reinigung von DNA aus Agarosegelen	36
2.4.6 A-Tailing	37
2.4.7 Ligation	37
2.4.8 Transformation elektrisch kompetenter Zellen	37
2.4.9 Kolonie-PCR	38

2.4.10	Aufreinigung von Plasmiden	38
2.4.11	Restriktionsverdau	38
2.4.12	Dephosphorylierung	39
2.4.13	Sequenzierung	39
2.4.14	Generierung der <i>HvSPMS1</i> - und <i>HvSPMS2</i> -Überexpressionskonstrukte	39
2.4.15	Generierung der <i>HvSPMS1</i> - und <i>HvSPMS2</i> -RNAi-Konstrukte	40
2.4.16	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> -vermittelte Transformation von Gerste	41
2.4.16.1	Ernte und Isolierung unreifer Gersteembryonen	41
2.4.16.2	Vorbereitung und Transformation der Agrobakterien	42
2.4.16.3	Transformation von Gerstenembryonen mit <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	42
2.4.16.4	Gewebekultur – Induktion von Spross- und Wurzelbildung	43
2.4.17	Expressionsanalyse der <i>Sperminsynthase</i> - und <i>Spermidinsynthase</i> -Gene in Gerste	44
2.5	Physiologische Methoden	46
2.5.1	Messung der stomatären Leitfähigkeit mittels Porometer	46
2.5.2	Messung der Blattflächentemperatur mittels Infrarotkamera	46
2.5.3	Stomata-Bioassays	46
2.5.4	Färbeverfahren zum Nachweis von ROS	47
2.5.5	Analyse der zytosolischen Calciumkonzentration an kompletten Pflanzen mittels Luminometer	48
2.5.6	Makroskopische bildliche Darstellung der zytosolischen Calciumkonzentration mittels Photonenzählkamera	48
2.5.7	Messung der zytosolischen Calciumkonzentration an einzelnen Schließzellen	49
2.6	Statistische Auswertung	50
3	Ergebnisse	52
3.1	Rolle von Spermin bei abiotischem Stress	52
3.1.1	Einfluss von Sperminapplikation auf die Salz- und Trockenstresstoleranz von Gerstenpflanzen	52
3.1.2	Einfluss von Sperminapplikation auf die Blattflächentemperatur und die stomatäre Leitfähigkeit von Gerstenpflanzen	56
3.1.3	Einfluss von Polyaminapplikation auf die Spaltöffnungsweite von Gerstenblättern	57
3.1.4	Einfluss von Inhibitoren der Polyaminoxidase auf die spermininduzierte Schließung der Stomata von Gerstenpflanzen	62
3.1.4.1	Nachweis reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) nach Sperminbehandlung bei Gerstenpflanzen	66
3.1.4.2	Beteiligung von extrazellulärem Calcium an der Spermin-induzierten Schließung von Stomata	69
3.2	Einfluss von Spermin auf zytosolische Calciumkonzentrationen in Pflanzen ...	70
3.2.1	Einfluss von Spermin auf die zytosolische Calciumkonzentration intakter Gerstenpflanzen	70
3.2.2	Einfluss von Spermin auf die zytosolische Calciumkonzentration intakter <i>Arabidopsis thaliana</i> -Sämlinge	73
3.2.3	Einfluss von Spermin auf die zytosolische Calciumkonzentration von Spross und Wurzel in <i>Arabidopsis thaliana</i>	76

3.2.4	Einfluss von Spermin auf zytosolische Calciumkonzentrationen von Schließzellen	80
3.3	Identifizierung und Analyse von Sperminsynthasen in Gerste	86
3.3.1	Identifizierung zweier Sperminsynthasen und einer Spermidinsynthese in Gerste	86
3.3.2	Expressionsanalysen der Spermidinsynthese- und Sperminsynthese-codierenden Gene in Gerste und <i>Arabidopsis thaliana</i>	89
3.3.2.1	Datenbankrecherchen	89
3.3.2.2	Expression der Spermidinsynthese- und Sperminsynthese-codierenden Gene der Gerste über einen kompletten Entwicklungszyklus	91
3.3.2.3	Expression der Spermidinsynthese- und Sperminsynthese-codierenden Gene der Gerste während Trockenstress	92
3.3.3	Erstellung von <i>SPMS</i> -Überexpressoren und Herunterregulierung der <i>SPMS</i> -Expression in Gerstenpflanzen – Ergebnisse der Transformation	93
4	Diskussion	96
4.1	Trägt das Polyamin Spermin zur Trocken- und Salzstresstoleranz von Gerste bei?	96
4.2	Interaktion von Polyaminen und Calcium	108
4.3	Sperminsynthasen in Gerste und <i>Arabidopsis</i>	112
4.4	Transformation von Gerste zur Analyse der Bedeutung von <i>SPMS</i> -Genen	115
5	Literaturverzeichnis	117
	Anhang	134
	Publikationen, Poster und Vorträge	145
	Eidesstattliche Versicherung	146
	Danksagung	147
	Curriculum Vitae	148

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Strukturformeln der Polyamine.....	23
Abbildung 2: Biosynthese (A) und Abbau (B) von Polyaminen.	25
Abbildung 3: Hypothese zur Einflussnahme von Spermin auf die abiotische Stresstoleranz von Gerste.....	30
Abbildung 4: Konstrukt für die Überexpression von <i>HvSPMS1</i> und <i>HvSPMS2</i>	40
Abbildung 5: RNAi-Konstrukt für die Suppression der Expression von <i>HvSPMS1</i> und <i>HvSPMS2</i>	40
Abbildung 6: Ablauf der Gerstentransformation.	41
Abbildung 7: Kalli auf Kallusinduktionsmedium.....	43
Abbildung 8: Methodischer Ablauf zur Calciummessung an Schließzellen.	50
Abbildung 9: Wachstum einer hydroponischen Gerstenkultur unter Zusatz von PEG 6000 (8 %, 14,8 %, 16 %) und 1 mM Spermin zum Medium.....	53
Abbildung 10: Wachstum einer hydroponischen Gerstenkultur unter Zusatz von NaCl (50, 100, 150 mM) und 1 mM Spermin zum Medium.....	55
Abbildung 11: Messung der stomatären Leitfähigkeit von Gerstenprimärblättern mittels Porometer.....	56
Abbildung 12: Fotografische Aufnahme von Gerstenpflanzen mittels Infrarotkamera zur Messung der Oberflächentemperatur der Primärblätter.	57
Abbildung 13: Einfluss von Polyaminen auf die Spaltöffnungsweite von Gerstenblättern.	58
Abbildung 14: Einfluss von Spermin auf die Spaltöffnungsweite unterschiedlicher Gerstensorten.	59
Abbildung 15: Einfluss von ABA und Spermin auf die Öffnungsweite der Stomata von Gerstenpflanzen.....	60
Abbildung 16: Zeitlicher Verlauf der durch Spermin induzierten Schließung der Stomata von Gerstenpflanzen.....	61
Abbildung 17: pH-Wert Abhängigkeit der durch Spermin induzierten Schließung der Stomata.	62
Abbildung 18: Einfluss des Polyaminoxidase-Inhibitors Guazatinacetat auf die Spermin-induzierte Schließung der Stomata.....	64
Abbildung 19: Einfluss von Ascorbinsäure auf die Spermin-induzierte Schließung der Stomata.	65
Abbildung 20: Einfluss des NADPH Oxidase-Inhibitors Diphenyliodoniumchlorid (DPI) auf die Spermin-induzierte Schließung der Stomata.	66
Abbildung 21: Färbung von Superoxidradikalen in Epidermisstreifen mittels Nitroblau-Tetrazolium (NBT).	67
Abbildung 22: Färbung von H ₂ O ₂ in Epidermisstreifen mittels 3,3-Diaminobenzidin (DAB).....	68
Abbildung 23: Wirkung von Spermin und H ₂ O ₂ auf Spaltöffnungen und Fluoreszenz der Schließzellen nach Färbung mit 2',7'-Dichlorfluorescein Diacetat (H ₂ DCFDA).	69
Abbildung 24: Einfluss des Calciumchelators EGTA auf die Schließung der Stomata nach Sperminapplikation.....	70
Abbildung 25: Aequorin-basierte Messung der [Ca ²⁺] _{cyt} nach Kälteschock an 7 Tage alten Gerstekeimlingen.	71
Abbildung 26: Aequorin-basierte Messung der [Ca ²⁺] _{cyt} nach Applikation von 1 mM Spermin zu 7 Tage alten Gerstekeimlingen.....	72

Abbildung 27: Reaktion der $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 7 Tage alter Arabidopsiskeimlinge in Abhängigkeit der Sperminkonzentration.....	73
Abbildung 28: Aequorin-basierte Messung der $[Ca^{2+}]_{cyt}$ nach Vorinkubation mit Guazatinacetat und Applikation von 1 mM Spermin zu 7 Tage alten Arabidopsiskeimlingen.	74
Abbildung 29: Aequorin-basierte Messung der $[Ca^{2+}]_{cyt}$ nach Vorinkubation mit Ascorbinsäure mit unterschiedlichen pH Werten und Applikation von 1 mM Spermin zu 7 Tage alten Arabidopsiskeimlingen.....	75
Abbildung 30: Aequorin-basierte Messung der $[Ca^{2+}]_{cyt}$ nach Vorinkubation mit EGTA und Applikation von Spermin (1 mM) zu 7 Tage alten Arabidopsiskeimlingen.	76
Abbildung 31: Aequorin-basierte Messung der $[Ca^{2+}]_{cyt}$ nach Sperminapplikation zu in Spross und Wurzel getrennte 7 Tage alte Arabidopsiskeimlinge.	77
Abbildung 32: Aequorin-basierte Messung der $[Ca^{2+}]_{cyt}$ nach Sperminapplikation (1 mM) an 7 Tage alten Arabidopsiskeimlingen.....	78
Abbildung 33: Aequorin-basierte Messung der $[Ca^{2+}]_{cyt}$ nach Sperminapplikation (1 mM) an 7 Tage alten, in Spross und Wurzel getrennten, Arabidopsiskeimlingen.	79
Abbildung 34: Ratiometrische Messung der $[Ca^{2+}]_{cyt}$ in Schließzellen 5 Wochen alter Arabidopsispflanzen nach Sperminapplikation (1 mM).	81
Abbildung 35: Ratiometrische Messung der $[Ca^{2+}]_{cyt}$ an Schließzellen 5 Wochen alter Arabidopsispflanzen nach Sperminapplikation (1 mM) (2 h Inkubationszeit oder Übernachtinkubation).	82
Abbildung 36: Ratiometrische Messung der $[Ca^{2+}]_{cyt}$ an Schließzellen 5 Wochen alter Arabidopsispflanzen nach Sperminapplikation.	83
Abbildung 37: Ratiometrische Messung der $[Ca^{2+}]_{cyt}$ in Schließzellen 5 Wochen alter Arabidopsispflanzen nach Vorinkubation mit Ascorbinsäure und Sperminapplikation (1 mM).	84
Abbildung 38: Ratiometrische Messung der $[Ca^{2+}]_{cyt}$ in Schließzellen 5 Wochen alter Arabidopsispflanzen nach Vorinkubation mit EGTA und Sperminapplikation (1 mM).	85
Abbildung 39: Ratiometrische Messung der $[Ca^{2+}]_{cyt}$ an Schließzellen 5 Wochen alter Arabidopsispflanzen nach Sperminapplikation und Zugabe von EGTA während der $[Ca^{2+}]_{cyt}$ -Antwort.....	86
Abbildung 40: Vergleich der Proteinsequenzen der Spermisynthasen HvSPMS1 und HvSPMS2 und der Spermidinsynthese HvSPDS.	87
Abbildung 41: Sequenzvergleich von SPMS- und SPDS-Proteinen.....	88
Abbildung 42: Phylogenetischer Baum von SPMS- und SPDS-Proteinen.	89
Abbildung 43: Expressionsmuster von Polyaminsynthase-codierenden Genen in unterschiedlichen Entwicklungsstadien von <i>Arabidopsis thaliana</i>	90
Abbildung 44: Expressionsmuster von Polyaminsynthase-codierenden Genen in unterschiedlichen Entwicklungsstadien der Gerste.	91
Abbildung 45: Relative Expression von <i>HvSPMS1</i> , <i>HvSPMS2</i> und <i>HvSPDS</i> in unterschiedlichen Entwicklungsstadien von Gerstenpflanzen (cv. Golden Promise).	92
Abbildung 46: Expression von <i>HvSPMS1</i> , <i>HvSPMS2</i> und <i>HvSPDS</i> während Trockenstress in Gerste (cv. Golden Promise) relativ zur ungestressten Kontrolle.	93
Abbildung 47: Regeneration und Selektion von transgenen Gerstenpflanzen.....	95

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Effizienz der Transformation von Gerste für <i>HvSPMS1</i> - und <i>HvSPMS2</i> -Überexpressoren und RNAi-Knock-down-Linien.	94
Tabelle 2: Verwendete Chemikalien mit Angabe des Herstellers und Katalognummer	134
Tabelle 3: Verwendete Antibiotika mit Angabe der Arbeitskonzentration	136
Tabelle 4: Verwendete Enzyme mit Herstellerangabe und Katalognummer	137
Tabelle 5: Verwendete Kits mit Herstellerangabe und Katalognummer	138
Tabelle 6: Verwendete Bakterienstämme und deren Selektion.....	138
Tabelle 7: Verwendete Oligonukleotide	139
Tabelle 8: Zusammensetzung der Gerstennährlösung (vollkonzentriert)	140
Tabelle 9: Zusammensetzung des LB-Mediums	141
Tabelle 10: Zusammensetzung des SOC Mediums.....	141
Tabelle 11: Zusammensetzung der Kulturmedien zur Anzucht transgener Kalli	142
Tabelle 12: Zusammensetzung des YEB-Mediums zur Kultivierung der Agrobakterien	143
Tabelle 13: Zusammensetzung des LB-Mediums zur Kultivierung der Agrobakterien	143
Tabelle 14: Zusammensetzung des SOC Mediums für elektrokompetente Agrobakterien	144
Tabelle 15: Zusammensetzung des Flüssigmediums zur Anzucht von Arabidopsispflanzen.....	144

Abkürzungsverzeichnis

[Ca ²⁺] _{cyt}	zytosolische freie Calciumionenkonzentration
½ MS	½-konzentriertes Murashige-und-Skoog Medium
2,4-D	2,4-Dichlorphenoxyessigsäure
ABA	Abscisinsäure
Abb.	Abbildung
Acc. Nr.	Akzessionsnummer
Amp	Ampicillin
as	antisense (Primer)
<i>A.th.</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
blast	<i>basic local alignment search tool</i>
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
Cb	Carbenicillin
cDNA	Komplementär-DNA
cv.	Kultivar
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP(s)	Desoxyribonukleotid(e)
DPI	Diphenyleniodoniumchlorid
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis (2-aminoethyl)-tetraessigsäure
ER	endoplasmatisches Reticulum
<i>et al.</i>	<i>et altera</i>
etc.	<i>et cetera</i>
EYFP	verstärkt gelb fluoreszierendes Protein
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
Hv	<i>Hordeum vulgare</i>
Hyg	Hygromycin
IPK	Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung
kb	Kilobasenpaar(e)
LB-Medium	Luria-Bertani Medium
max.	maximal
min.	minimal
min	Minuten
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
N-terminal	amino-terminal
OD	optische Dichte
ORF	<i>open reading frame</i>
PAO	Polyaminoxidase
PCR	Polymerasekettenreaktion
Put	Putrescin
rH	relative Luftfeuchte
Rif	Rifampicin
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
RNAi	RNA Interferenz
ROS	reaktive Sauerstoffspezies

RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
s	<i>sense</i> (Primer)
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
sek	Sekunde
Spc	Spectinomycin
Spd	Spermidin
SPDS	Spermidinsynthase (Protein)
<i>Spds</i>	Spermidinsynthase (Gen)
Spm	Spermin
SPMS	Sperminsynthase (Protein)
<i>SpmS</i>	Sperminsynthase (Gen)
Strep	Streptomycin
T0	transgene Generation 0
T1	transgene Generation 1
Tab.	Tabelle
Tic	Ticarcillin
TSAP	thermosensitive alkalische Phosphatase
Tspm	Thermospermin
TSPMS	Thermosperminsynthase (Protein)
<i>Tspms</i>	Thermosperminsynthase (Gen)
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
WT	Wildtyp
X-Gluc	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-glucuronsäure
YC3.6	Yellow Cameleon 3.6
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil

1 Einleitung

1.1 Gerstenpflanzen unter Stress

In den letzten 40 Jahren hat Trockenheit weltweit mehr Menschen betroffen als jede andere Naturgefahr. Trockenheit tritt in fast allen Regionen der Erde auf und ist eine Naturerscheinung mit unterschiedlicher Dauer, Intensität, regionaler Ausdehnung und damit auch regionaler Auswirkung. Kommt es zu Dürre, ist die Landwirtschaft der erste und am stärksten betroffene Sektor (FAO, 2018). Verringerte Niederschlagsmengen, Zunahme von Hitzewellen und Dürrezeiten (Parry et al. 1999; Ciais et al. 2005) beeinflussen unmittelbar die Erntemenge und -qualität von Getreide. Zu den Hauptgetreidegattungen zählen unter anderem Weizen, Reis, Mais, Gerste sowie Hafer, Quinoa und Hirse. Vor allem in Entwicklungsländern, wie zum Beispiel Ägypten, Tunesien, Indien und Pakistan werden auf Basis von Modellrechnungen zur Klimaentwicklung Erträge durch abiotische Stressfaktoren wie Trockenheit, extreme Temperaturen, Versalzung und Mangel an Verfügbarkeit von Nährstoffen bis zum Jahr 2020 um 50% sinken (Wang et al. 2003; Bitu et al. 2013). Durch den Klimawandel wird es zu einer Zunahme von Dürren mit einer gehäuften Schwere und Dauer kommen (FAO, 2018). Dies führt, neben starken ökologischen Auswirkungen auf die Landwirtschaft, auch zu sozialen und ökonomischen Problemen, wie massiven Hungersnöten, Migration, Verschlechterung von natürlichen Ressourcen und einer reduzierten Wirtschaftsleistung. Trockenheit zählt daher zu den wichtigsten Stressoren von Pflanzen im landwirtschaftlichen Bereich weltweit.

Während ihrer kompletten Entwicklung ist die Gerste, wie alle Pflanzen, unterschiedlichen Stressoren ausgesetzt. Eine Einteilung erfolgt in biotische und abiotische Stressoren. Die biotischen Stressoren können die Konkurrenz verschiedener Pflanzen untereinander sein (Allelopathie) als auch die negativen Effekte durch zum Beispiel Tierfraß oder Schädlingsbefall. Beides kann eine hemmende Wirkung auf einzelne Pflanzen haben und zu Entwicklungsverzögerung während der Keimung, Wachstumsverzögerung bzw. Wachstumsminderung oder zu morphogenetischen Auswirkungen führen. Neben biotischem Stress durch den Befall mit Phytopathogenen wie zum Beispiel dem Gelbverzwergungs-Virus oder Mehltau (*Blumeria graminis*), aber auch durch Schädlinge wie Wurzelnematoden und Blattläuse, verursachen vor allem die genannten abiotischen Faktoren Trockenheit, Nährstoffmangel und Versalzung Wachstumseinbußen und Ertragsverluste. Phasen mit unterdurchschnittlichen Niederschlägen führen zu Trockenstress innerhalb der Pflanze. Die Menge an

verfügbaren Wasser in der Rhizosphäre fällt dann unter die, für die betreffende Pflanze, erforderliche Wassermenge um ein effizientes Wachstum und die Biomasseproduktion aufrechtzuerhalten (Deikmann et al. 2012). Der Wassermangel kann sich auf eine Vielzahl von physiologischen Prozessen auswirken, unter anderem auf die Photosynthese oder die Mineralstoffaufnahme. Durch eine vermehrte Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) kommt es zu oxidativen Stress und durch eine Veränderung der Spaltöffnungsweite wird zum Beispiel der Gasaustausch beeinträchtigt (Kar 2011). Spaltöffnungen sind Poren in Blättern, die von zwei parallel orientierten Zellen gebildet werden und zum Gasaustausch dienen. Diese sogenannten Schließzellen bilden zusammen mit den häufig vorkommenden und besonders gestalteten Nebenzellen den Stomakomplex (Frey und Lösch 2010). Die Nebenzellen sind indirekt an der Funktion der Schließzellen beteiligt, indem sie diesen reversibel Kalium für die Stomataöffnung bereitstellen. Befinden sich die Stomata auf der Blattunterseite, nennt man sie hypostomatisch; amphistomatisch sind sie bei einer Verteilung sowohl auf der Blattober- und -unterseite, sowie epistomatisch wenn die Stomata nur auf der Blattoberseite liegen (Bresinsky et al., 2008). Je nach Aufbau sind verschiedene Stomatatypen zu unterteilen. Der Mniun-Typ zeigt weitgehend unverdickte Zellwände und kommt z.B. bei Moosen und Farnen vor. Bei Amaryllispflanzen ist der Rücken unverdickt bei einer stark verdickten Bauchwand (Amaryllideen-Typ). Der Helleborus-Typ besitzt ungleichmäßig verdickte Zellwände (viele Dikotyledone) und viele Poaceae, wie zum Beispiel die Gerste, besitzen hantelförmige Schließzellen mit einer stark verdickten Mitte (Gramineen-Typ) (Bresinsky et al., 2008). Die ungleichmäßige Verdickung der Zellwände der Schließzellen führt bei verändertem Innendruck (Turgor) zu einer Veränderung der Gestalt der Zellen. Sinkt der Turgor der beiden Schließzellen, bewegen sich diese aufeinander zu und führen zum Stomataschluss. Steigt der Turgor an, bewegen sich die Schließzellen durch ihre Gestaltänderung auseinander (Bresinsky et al., 2008). Der Wassermangel kann weiterhin dazu führen, dass die Zellteilung, das Stammwachstum und die Wurzelzellproliferation gehemmt werden (Gill et al. 2010). Das Absenken des Bodenwasserpotentials, führt zur Verringerung des Pflanzenwasserpotentials innerhalb der Pflanze. Um die Aufrechterhaltung des Gewebewasserpotentials zu gewährleisten, erfolgt einerseits eine Erhöhung der Wasseraufnahme und andererseits die Einschränkung des Wasserverlusts (Antunes et al. 2018). Auch eine Versalzung des Bodens verursacht ein Absenken des osmotischen Potentials in der Bodenlösung und führt damit zu Wasserstress in der Pflanze. Bei osmotischen Stress kommt es innerhalb der Pflanze, wie auch bei reinem Trockenstress, ebenfalls zum Absenken des Wasserpotentials. Die meisten dadurch betroffenen zellulären Prozesse, welche durch

Trockenheit und Salzstress verursacht werden sind, gleich. Neben dem osmotischen Stress verursachen hohe Salzkonzentrationen im Boden zudem auch ionischen Stress. Die Akkumulation der beiden Ionen Na^+ und Cl^- führt zum Beispiel zur vorzeitigen Seneszenz der Blätter (Munns et al. 2008). Das Hauptproblem stellt die erhöhte Na^+ -Konzentration im Zytosol dar, was hauptsächlich zur Inhibierung von kaliumabhängigen Enzymen führt (Maathuis 2009, Maathuis et al. 2014). Die Hauptstrategien der Pflanzen, mit Trockenheit und dem daraus resultierenden Wassermangel umzugehen, sind Flucht (*Escape*), Vermeidung (*Avoidance*) und Toleranz (Zhang 2007, Levitt 1980). In Abhängigkeit vom Einsetzen, der Dauer und der Intensität kommt es zu komplexen Auswirkungen des Stressors auf die Pflanze. Nach Einwirken eines Stressors wird die Pflanze zunächst in eine Alarmphase gehen, und es kommt zu charakteristischen Veränderungen, wie z.B. zur Minderung des Wachstums (Romero-Puertas et al. 2013). Kommt es zur Überschreitung eines für die jeweilige Pflanze spezifischen Toleranzbereichs, kann dies zur akuten Schädigung bis zum Absterben führen. Im Anschluß an diese erste Alarmphase kommt eine Resistenzphase mit Restitution und *Hardening*. In dieser Widerstandsphase hat die Pflanze eine erhöhte Widerstandskraft gegen den Stressor, das heißt es kann zu spezifischen und/oder unspezifischen Abwehrreaktionen (Resistenz) kommen. Im Ergebnis ist die Pflanze angepasst an den Stressor. Bei andauernder Einwirkung des Stressors kommt es zur Ermüdungsphase, und es können chronische Schäden an den Pflanzen auftreten. Dieses Stresskonzept ist sowohl abhängig von den einzelnen Stressoren als auch von den einzelnen Pflanzen, auf welche der Stressor wirkt (Lüttge et al. 2010). Ist die Pflanze generell unfähig, den wahrgenommenen Stress zu umgehen, kann dieser letal wirken. Die Bewältigung des Stressses in der zweiten Phase kann durch Flucht (*Escape*) erfolgen. Mit Hilfe dieser Strategie entgeht die Pflanze der schädigenden Auswirkung des z. B. Trockenstresses durch einen angepassten Phänorhythmus (Basu et al. 2016). Auch das Überstehen von längeren wasserarmen Perioden durch morphologische Umwandlung der Blätter und des Sprosses zu Wasserspeichern ist bei einigen sukkulenten Pflanzenarten möglich. Die erhöhte Widerstandsfähigkeit (Resistenz) kann durch eine Vermeidungsstrategie (*Avoidance*) oder dem Ertragen des Stressses (Toleranz) erfolgen (Levitt 1980). Die Vermeidungsstrategie beruht in einer verbesserten Wasseraufnahme unter anderem durch die Ausbildung eines tief verzweigten Wurzelsystems oder der Überdauerung in Form von Samen und an vor Austrocknung geschützten Orten (z.B. Geophyten) (Muller et al. 2011, Frey und Lösch 2010). Des Weiteren können Schäden durch Trockenstress vermieden werden, durch die Minderung des Wasserverlustes und durch eine effektive Wasserspeicherung. Das Entstehen eines niedrigen Wasserpotentials kann durch den Abscisinsäure (ABA) induzierten Stomataschluss, über Reaktionen wie das Blattrollen

sowie einer angepassten Blattepidermisstruktur wie Verkorkung und Haarbildung erfolgen (Osmolovskaya et al. 2018). Die Beschränkung der Transpiration durch eine Verdickung der Cuticula und die verminderte Anzahl von Spaltöffnungen (Stomata) pro Fläche sind zusätzliche wichtige Parameter, um ein zu starkes Verdunsten von Wasser und in Folge dessen ein Welken von Blättern zu verhindern. Hält der Trockenstress allerdings für einen längeren Zeitraum an sind die Vermeidungsstrategien teilweise nicht effektiv genug, um das Pflanzenwachstum und die Produktivität aufrechtzuerhalten. Dann erfolgt die Entwicklung einer Austrocknungstoleranz durch eine osmotische Anpassung wie z. B. der Akkumulation von kompatiblen gelösten Stoffen und dem Schutz von Proteinen und einer Stabilisierung der Zellwände. Des Weiteren können die Erweiterung der antioxidativen Kapazität durch ROS-Entgiftung und ein angepasster Stoffwechsel erfolgen (Verslues et al. 2016). Die Toleranz führt zum langfristigen Überleben und zur Produktion von Nachkommen einer Art (Frey und Lösch 2010).

Die Züchtung trockenstresstoleranter Getreidesorten steht aufgrund von Ertragseinbußen durch klimatisch verursachten Trockenstress im Fokus der Züchtungsforschung. Trockenstress durch Frühjahrs- und Sommertrockenheit während der Zeit der Blüte und Samenfüllung führt zu geringeren Ernten mit weniger und kleineren Körnern mit schlechterer Qualität. Im Vergleich zu Weizen ist Gerste eine generell sehr trockenstresstolerante Getreideart. Sie zeichnet sich durch ihre genetische Vielfalt und die sehr hohe Toleranz einzelner Genotypen gegenüber abiotischem Stress aus. Sie zählt zur Familie der Süßgräser (Poaceae). Das Genom ist diploid ($2n = 2x = 14$ Chromosomen). Als ältestes Kulturgetreide wird Gerste weltweit neben Reis, Mais und Weizen als viertwichtigste Kulturpflanze zum Anbau genutzt. Die prognostizierte Erntemenge für Gerste 2018/19 liegt bei 139 Mio t, hinter Weizen mit 730 Mio t und Reis mit 498 Mio t (USDA Foreign Agricultural Service). Heute genutzte Sorten gingen wahrscheinlich aus der zweizeiligen Wildgerste *Hordeum vulgare L. ssp. spontaneum* (C. Koch) Thell hervor. Eine Kultivierung begann vor etwa 10.000 Jahren im Bereich des fruchtbaren Halbmondes. Weitgehend erhalten hat sich die hohe genetische und phänotypische Diversität der Gerste vor allem in den Ursprungsgebieten (Wang et al. 2015). Die Verbreitung der Gerste erstreckt sich weltweit neben den gemäßigten Klimazonen auch auf Gebiete mit semiaridem und aridem Klima, wie beispielsweise Zentralasien und Nordafrika (FAO, 2018). Während in Deutschland für einjährige Sommergerste oder überjährig als Wintergerste tiefgründige und gut durchfeuchtete Böden zur Verfügung stehen, ist der Anbau in von Trockenperioden beeinflussten Zonen geprägt von häufigem Wassermangel. Dies beeinflusst unter anderem die Samenentwicklung und führt zu schlechteren Ernten und verminderter Nährstoffqualität der Körner. Durch die globalen Folgen des Klimawandels kommt es mittlerweile auch in

Deutschland immer häufiger zu Trockenperioden im Sommer und dadurch zu Ertragsverlusten auch im Gerstenanbau. Laut Deutschem Bauernverband (DBV) kam es durch den anhaltend trockenen Sommer 2018 zu einem Rückgang der Getreideernte in Deutschland von 26 Prozent. Dies entspricht einem Rückgang von durchschnittlich 48 auf 36 Millionen Tonnen. Die angebaute Wintergerste wird hier vor allem als Tierfutter verwendet. Die weniger ertragreiche Sommergerste wird unter anderem zur Herstellung von Bier, aber auch für Graupen und gelegentlich für Mehl genutzt (Bothmer et al. 2003). In dieser Arbeit wurde mit der Sommergerstensorte Golden Promise gearbeitet. Diese Sorte besitzt wirtschaftlich keine Bedeutung mehr, dient jedoch als Modellsorte in genetischen und funktionellen Analysen, da sie eine hohe Transformationseffizienz besitzt und sich damit zur Erstellung transgener Linien eignet (Hensel et al. 2008).

1.2 Trockenstressresistenz und Schließzellregulation

Durch die zunehmende Verknappung weltweiter Wasserressourcen stellt Wasser den global wichtigsten limitierenden landwirtschaftlichen Produktionsfaktor dar. Trockenstressresistenz, durch welche Pflanzen gegenüber der schädlichen Wirkung von Trockenheit teilweise oder ganz geschützt sind, ist somit essentiell für viele Pflanzen. Dies geschieht, indem die Pflanzen sich morphologisch und/oder physiologisch anpassen und damit der schädigenden Einwirkung des Wassermangels entgegenreten. Um die Wirkung des Trockenstresses, wie zum Beispiel den erhöhten Turgorverlust, zu vermeiden, haben Pflanzen eine angepasste Osmoregulation entwickelt. Einige Pflanzen vermeiden Trockenstress mittels Überdauerungsorganen. Dazu überstehen sie im Samenstadium länger andauernde Trockenphasen und verringern bzw. vermeiden damit Verluste durch Austrocknen (Leprince et al., 1993). Verstärktes Wurzelwachstum (Tiefwurzler, Mykorrhiza) sowie ein angepasster Entwicklungszyklus sind weitere Möglichkeiten von Pflanzen, Trockenstress zu vermeiden. Des Weiteren kann die intrazelluläre Einwirkung von Trockenstress durch eine angepasste Stressreaktion mittels Bildung von Stressproteinen (z.B. Hitzeschockproteine) oder einer Veränderung der Membranlipide erfolgen (Landi et al., 2019). Sinkt die Bodenfeuchte aufgrund von Wassermangel, reagieren Pflanzen wenn ein kritisches Wasserpotential erreicht ist. Der stomatare Widerstand wie auch der Abscisinsäurespiegel erhöhen sich, die Transpirationsrate und die Photosyntheserate nehmen ab. Durch die Abnahme der Transpiration kommt es gleichzeitig zum Anstieg der Temperatur in der Pflanze (Monteith et al. 1996). Die Anpassung der Photosynthese an die Temperaturverhältnisse ist eine zusätzliche Strategie, um Trockenstress zu überstehen. Eine physiologische Anpassung an Trockenheit stellen C₄-Pflanzen und CAM-Pflanzen (CAM =

Crassulacean Acid Metabolism) dar. Während der Calvin-Zyklus und die CO_2 -Fixierung in C_4 -Pflanzen räumlich voneinander getrennt sind, ist es in CAM-Pflanzen eine zeitliche Trennung voneinander. Die Fixierung des CO_2 und die Umwandlung in Malat finden nur in der Nacht durch Öffnung der Stomata statt. Tagsüber bleiben die Spaltöffnungen geschlossen, verhindern damit die erhöhte Verdunstung, und das aus dem Malat freigesetzte CO_2 wird in den Calvin-Zyklus überführt (Leegood 2013). Gerste zählt zu den C_3 -Pflanzen, in welchen die Photosyntheseleistung während Trockenphasen reduziert ist, da die Spaltöffnungen zur Verringerung von Wasserverlust geschlossen sind.

Chemische Signale aus der Wurzel und veränderte Wasserpotentiale im Spross führen nach einem Austrocknen des Bodens zu unterschiedlichen Signalen, welche den Öffnungsgrad der Stomata beeinflussen. Zudem öffnen sich Stomata in Reaktion auf blaues Licht, um den Gasaustausch zwischen der Pflanze und der Atmosphäre zu gewährleisten. Wird die in der Plasmamembran lokalisierte H^+ -ATPase durch Blaulicht aktiviert, führt dies zum Transport von Protonen unter Hydrolyse von ATP über die Plasmamembran aus der Zelle in den Apoplasten. Für den Transport eines H^+ ist ein ATP nötig, welches aus der Photophosphorylierung oder der Atmungskettenphosphorylierung stammt. Die Plasmamembran wird durch diesen Vorgang hyperpolarisiert (Shimazaki et al., 2007; Marten et al., 2010). Aufgrund der Hyperpolarisation entsteht ein elektrischer Gradient, welcher einwärtsgerichtete, selektive K^+ -Kanäle aktiviert und den Einstrom von K^+ induziert (Lebaudy et al., 2008). Dieser Einstrom führt zur Akkumulation von K^+ und den Gegenionen Cl^- , Nitrat und Malat. Gleichzeitig werden K^+ und Cl^- über die im Tonoplasten lokalisierte K^+/H^+ -Antiporter NHX1 und NHX2 sowie über vakuoläre Chloridkanäle in die Vakuole transportiert (Inoue et al. 2017). Eine Alkalisierung des Zytoplasmas wird dadurch verhindert, dass Phosphoenolpyruvat durch die PEP-Carboxylase in Oxaloesigsäure überführt wird, welche dann durch die Malat-Dehydrogenase und NADPH zu Malat reduziert wird. Das Wasserpotential der Schließzellen verringert sich schließlich durch die Akkumulation der Ionen, was zur Aufnahme von Wasser in die Vakuole führt. Dieser Wasserinflux lässt den Turgor steigen und es kommt zur Öffnung der Stomata (Inoue et al., 2010; Marten et al., 2010).

Abcisinsäure (ABA) als wichtiges Phytohormon während Trockenstress spielt eine wichtige Rolle in der Regulation der Schließzellen. Kommt es aufgrund von Wassermangel zu einer zellulären Dehydrierung, führt dies zum Anstieg der Konzentration des Phytohormons ABA im Blatt und zu einer Alkalisierung des Zytosols. Durch den Anstieg der Konzentration von ABA, welches in den Schließzellen

synthetisiert wird, kommt es zur Aktivierung einer komplexen Signalkaskade mit Ca^{2+} -abhängigen und Ca^{2+} -unabhängigen Signalwegen, welche den Verschluss der Stomata induzieren und damit den Transpirationsverlust verringern. Die Signalwege werden wiederum durch verschiedene Signalintermediate aktiviert, wie zum Beispiel Wasserstoffperoxid oder Stickstoffmonoxid. ABA induziert einerseits den Stomataschluss an bereits offenen Schließzellen, hemmt aber andererseits auch die lichtinduzierte Öffnung der Schließzellen. Die Öffnung durch Blaulicht wird durch ABA auf drei unterschiedliche Arten unterdrückt. Erstens kommt es durch ABA zu einer beschleunigten Freisetzung von Ionen aus den Schließzellen. Dies geschieht über eine Aktivierung von Anionenkanälen des S- und R-Types sowie auswärts gerichteten K^+ -Kanälen (Jarzyniak et al. 2014). Zweitens wird durch ABA die Expression von K^+ -Kanälen verringert, indem es zu einer Inaktivierung von AKS-Transkriptionsfaktoren (ABA-responsive Kinase Substrate) mittels Phosphorylierung durch OST1 (Open Stomata 1), einer durch ABA aktivierten Proteinkinase, in Schließzellen kommt (Takahashi et al., 2013, 2016). Durch Endozytose kommt es drittens zur Verlagerung von KAT1 aus dem Plasmalemma in Kompartimente der Endomembran. Dadurch reduziert sich die Abundanz des K^+ -Kanals im Plasmalemma weiter (Sutter et al. 2007).

1.3 Die Rolle von Calcium in Pflanzen

Calciumionen (Ca^{2+}) zählen zu den wichtigsten intrazellulären sekundären Botenstoffen (Berridge et al. 2000). Als Pflanzennährstoff ist Ca^{2+} essentiell für Wachstum und Entwicklung. Als zweiwertiges Kation ist es wichtig für den strukturellen Aufbau der Zellwand und von Membranen. In der Zellwand liegt es als Ca^{2+} -Pectat vor und bindet so Pectin-Polymere aneinander. Des Weiteren dient es als Gegenkation von organischen und anorganischen Anionen in der Vakuole. Eine wesentliche Rolle spielt Ca^{2+} zudem als sekundärer Botenstoff im Zytosol und in Organellen (Knight et al., 1997). Eine vorübergehend erhöhte Konzentration von freiem zytosolischem Calcium ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$) ist an vielen Signaltransduktionsmechanismen in Pflanzen beteiligt und stellt z.B. ein frühes Element der Aktivierung von Signalnetzwerken bei durch Pathogene ausgelöstem biotischem Stress dar (Thor und Peiter 2014; Stäb und Ebel 1987; Nürnberger et al. 1994; Tavernier et al. 1995). Aber auch andere physiologische Stimuli bewirken eine transient erhöhte $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$. So führen abiotischer Stress, wie Salz, Trockenheit und Kälte (Knight et al. 1997, 1991), aber auch Pflanzenhormone, Berührung, Fraßschäden (Knight et al. 1991; Moyon et al. 1998; Kiep et al. 2015) und oxidativer Stress (Price et al. 1994; Clayton et al. 1999) zu erhöhten $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ -Werten. Diese Ca^{2+} -Signale steuern eine Vielzahl von nachgelagerten Prozessen. Die Veränderungen der $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ haben

ihren Ursprung in der Vakuole und anderen internen Speichern oder im Apoplasten. Die angrenzenden Membranen besitzen Ca^{2+} -Kanäle und -Transporter, welche zur Aufrechterhaltung der zytosolischen Ca^{2+} -Homöostase dienen. Mit 100 nM ist die Konzentration von freiem zytosolischen Ca^{2+} in der unstimulierten pflanzlichen Zelle im Vergleich zum Apoplast oder der Vakuole mit Werten von mehr als 1 mM sehr gering. Die genannten äußeren oder endogenen Reize können in der Zelle zu einem schnellen Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ führen, was ein intrazelluläres Signal als Reaktion auf den Reiz darstellt. In Abhängigkeit vom auslösenden Stimulus können verschiedene $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ -Reaktionen auftreten. So konnten sowohl einzelne Erhöhungen der Ca^{2+} -Konzentration, als auch langanhaltende, zyklisch auftretende Ca^{2+} -Signale (Ca^{2+} -Oszillationen) beobachtet werden. Ca^{2+} -Oszillationen können sich in der Frequenz der einzelnen, hintereinander auftretenden Spikes in Abhängigkeit von äußeren Reizen unterscheiden (Malho et al. 1998, Allen et al. 1999, 2001). Das heißt, dass in Abhängigkeit vom äußeren Reiz mittels stressspezifischer Ca^{2+} -Signatur durch spezifische Ca^{2+} -sensitive Proteine eine spezifische Antwort erfolgen kann (McAinsh und Hetherington 1998). Osmotischer Stress als äußerer Reiz führt zum Beispiel in der Modellpflanze Arabidopsis zum Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$. Dieser ist essentiell für die Expression trockenstressinduzierter Gene (Knight et al. 1997).

Eine Aktivierung des Ca^{2+} -Einstroms über die Plasmamembran kann in Pflanzen auch durch Trockenstress hervorgerufen werden. Für Arabidopsis wurde gezeigt, dass der OSCA1-Kanal eine wichtige Funktion in der Registrierung von Trockenstress und dem osmotisch induzierten Ca^{2+} -Einstrom über die Plasmamembran einnimmt (Yuan et al. 2014). Expressionsanalysen zeigten eine Promotoraktivität in Schließzellen und Wurzeln. In *osca1*-Mutanten wurden auf osmotischen Stress geringere Ca^{2+} -Signale in Schließ- und Wurzelzellen detektiert als im Wildtyp. Ebenso konnten eine verminderte Regulation der Transpiration und ein vermindertes Wurzelwachstum bei osmotischem Stress beobachtet werden (Yuan et al. 2014).

1.4 Generierung von zytosolischen Calciumsignalen

Eine Voraussetzung für Ca^{2+} -Signale ist die Ca^{2+} -Homöostase, die einen Ausgleich zwischen dem hohen Ca^{2+} -Bedarf z.B. für die Stabilität der Zellwand (Conn et al. 2011) einerseits und dem niedrigen Ca^{2+} -Spiegel im Zytosol andererseits herstellt. Die Generierung von zytosolischen Ca^{2+} -Signalen entsteht durch ein komplexes Zusammenspiel von Ca^{2+} -Kanälen, -Pumpen und -Transportern welche den Ca^{2+} -Einstrom (Influx) und -Ausstrom (Efflux) koordinieren. Die Veränderung von zytosolischen Ca^{2+} -Konzentrationen wird daher durch zwei gegensätzlich verlaufende

Reaktionen verursacht; zum einen durch den Einstrom von Ca^{2+} durch Ionenkanäle entlang eines elektrochemischen Gradienten und zum anderen durch den aktiven Ausstrom des Ca^{2+} mittels Pumpen (Ca^{2+} -ATPasen) und $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ -Antiporter (Sanders et al. 2002). Durch die Aktivierung von Ca^{2+} -Kanalproteinen erfolgt der Ca^{2+} -Einstrom über die Zellmembranen. Je nach Zelltyp und Gewebeart gibt es unterschiedliche Ionenkanaltypen. Eine Einteilung kann erfolgen in spannungsabhängige oder spannungsunabhängige, ligandenabhängige oder dehnungsaktivierte Ca^{2+} -Kanäle (Dodd et al. 2010). Glutamatrezeptoren (GLRs), als nicht selektive Kationenkanäle, sind ein Beispiel für Regulatoren des Ca^{2+} -Einstroms (Davenport 2002). Es wird angenommen, dass GLRs wichtig für die Ernährung der Pflanze mit Ca^{2+} sind, sowie bei der Vermittlung von Ca^{2+} -Reaktionen bei Kältestress und in der systemischen Reizleitung eine Rolle spielen (Kudla et al. 2010). Der als TPC1 (Two Pore Channel) benannte calciumpermeable Kanal in der Membran der Vakuole spielt eine Rolle in der Schließzellregulation von Arabidopsis in Reaktion auf externes Ca^{2+} (Peiter, 2011). Seit einiger Zeit ist zudem bekannt, dass TPC1 an der Bildung systemischer Ca^{2+} -Signale beteiligt ist. Versuche an Arabidopsispflanzen zeigten, dass durch Blattfraß der Raupe *Spodoptera littoralis* neben Ca^{2+} -Signalen im befallenen Blatt auch ein weiteres, systemisches Signal ausgelöst wird. Dieses systemische Signal konnte in TPC1-Mutanten nicht mehr dokumentiert werden (Kiep et al. 2015). Der Ausstrom von Ca^{2+} aus dem Zytosol in den Apoplast oder in intrazelluläre Organellen erfolgt gegen einen elektrochemischen Gradienten und verbraucht Energie. Der Efflux erfolgt über Ca^{2+} -ATPasen vom P-Typ und durch $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ -Antiporter (Sanders et al. 2002). Während die Antiporter den Ausstrom des Ca^{2+} mit niedriger Affinität und hohem Umsatz regulieren, erfolgt der Ca^{2+} -Ausstrom über die ATPasen mit hoher Affinität und niedrigem Umsatz. Dies lässt darauf schließen, dass die Antiporter die Ca^{2+} -Konzentration nach einer stressinduzierten Erhöhung wieder auf wenige Mikromolar reduzieren, während die ATPasen wichtig dafür sind, die niedrigen Ca^{2+} -Konzentrationen während Ruhephasen aufrechtzuerhalten (Kudla et al. 2010).

Die erhöhten Ca^{2+} -Konzentrationen während eines Ca^{2+} -Signals werden durch Ca^{2+} -bindende Proteine mittels EF-Hand-Domänen erkannt (Sanders et al. 2002). Diese Ca^{2+} -Sensoren vermitteln die Umsetzung der in den spezifischen Ca^{2+} -Signaturen enthaltenen Information in *downstream*-Antworten, wie Proteinphosphorylierungen oder transkriptionelle Änderungen. Die Ca^{2+} -Sensoren werden in vier Klassen eingeteilt. Calmoduline (CaMs) sind in tierischen und pflanzlichen Organismus hoch konserviert, während Calmodulin-ähnliche Proteine (CMLs), Ca^{2+} -abhängige Proteinkinasen (CDPKs) und Calcineurin B-ähnliche Proteine (CBLs) pflanzenspezifisch sind (Tuteja et al. 2007). Die Spezifität der Ca^{2+} -Signale wird bestimmt durch deren Signatur und

Lokalisation; unterschiedliche Stresseinwirkungen auf die Pflanze bedingen unterschiedliche Stresssignaturen (Webb et al. 1996). So verursacht Salzstress häufig eine biphasische Ca^{2+} -Antwort, bestehend aus einer anfänglichen transienten Erhöhung und einer nachfolgenden Oszillation. Im Gegensatz zu Salzstress bewirkt Kältestress lediglich eine monophasische Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ (Kiegle et al. 2000). In diesen Experimenten wurden jedoch ganze Pflanzen analysiert, die aus nicht synchronisierten Zellen zusammengesetzt sind. Nach den mathematischen Modellierungen von Dodd et al. (2006) besteht eine Beziehung zwischen den Veränderungen der $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ einer einzelnen Zelle und denen der gesamten Pflanze. Die Studie zeigte, dass die Ca^{2+} -Signatur der Gesamtpflanze möglicherweise auf bestimmte definierte Ca^{2+} -Oszillationen einzelner Zellen zurückzuführen ist. Die Herkunft aus unterschiedlichen Ca^{2+} -Speichern ermöglicht eine weitere Erhöhung der Spezifität der Ca^{2+} -Signale. So kann das Signal aus extrazellulären Speichern wie der Zellwand kommen oder aber auch aus intrazellulären Speichern innerhalb der Zelle. Membranassoziierte Ca^{2+} -Sensoren sind in der Lage, diese örtlichen Ca^{2+} -Veränderungen zu dekodieren (Kudla et al. 2010).

Letztendlich führt eine Änderung der Konzentration des sekundären Botenstoffes Ca^{2+} zur Antwort auf unterschiedliche Einwirkungen auf die Pflanze durch zum Beispiel Aktivierung reizspezifischer Transkriptionsfaktoren und dadurch zur Regulation von stressaktivierten Genen. Als weitere Antwort kann die Bildung von regulatorischen Molekülen induziert werden. Hierzu zählen pflanzliche Hormone wie ABA, Ethylen oder Jasmonsäure (White et al. 2003; Dodd et al. 2010).

1.5 Vorkommen und Biosynthese von Polyaminen

1678 wurden von Antoni van Leeuwenhoek erstmals mikroskopisch Phosphatkristalle aus einer Verbindung, welche aus menschlichem Samen extrahiert wurde, nachgewiesen. Später erhielt sie aufgrund ihres Ursprungs die Bezeichnung Spermin. Durch die hohe Polarität und Wasserlöslichkeit sowie die hohe Oxidationsempfindlichkeit an der Luft gelang eine Isolierung und damit die Aufklärung der kompletten Struktur erst im Jahr 1924 (Geneste und Hesse 1998). Spermin gehört zur Gruppe der Polyamine, welches kleine gesättigte, offenkettige oder zyklische organische Polykationen sind. Sie sind bei physiologischem pH-Wert positiv geladen und besitzen zwei oder mehrere primäre Aminogruppen ($-\text{NH}_2$) (Abb.1).

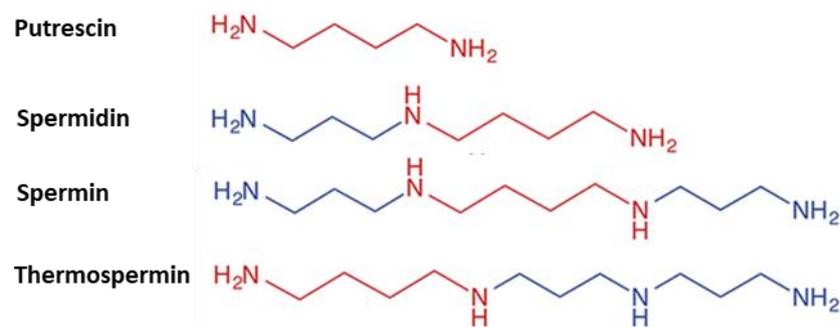


Abbildung 1: Strukturformeln der Polyamine. Rote Markierungen kennzeichnen die Grundstruktur des Putrescin, blaue Markierungen zeigen die Aminopropylteile welche an die Grundstruktur des Putrescin angehängt werden, um die entsprechenden Polyamine zu bilden. Grafik aus Tiburcio et al. 2014, verändert.

Sie kommen in nahezu allen Organismen, einschließlich Bakterien, Tieren und Pflanzen vor (Hussain et al. 2011). Eine Ausnahme hiervon stellen einige extrem halophile Archaeobakterien, wie Halobacterium und Halococcus, dar (Hamana et al. 2009). Durch ihre positive Ladung können Polyamine mit negativ geladenen Molekülen, wie zum Beispiel Nukleinsäuren, Proteinen, Phospholipiden und Zellwandkomponenten interagieren (Martin-Tanguy et al. 2001; Kakkar und Sawhney 2002). In Pflanzen sind Polyamine sowohl als freie basische Verbindung als auch in konjugierter Form zu finden. Die in Pflanzen am häufigsten vorkommenden Polyamine sind Spermidin und Spermin, sowie das Diamin Putrescin. Daneben können auch noch weitere Polyamine, wie Cadaverin, Thermospermin oder Norspermin, vorkommen. Der Biosyntheseweg von Polyaminen in Pflanzen unterscheidet sich von dem in Tieren darin, dass es in Pflanzen zwei Vorstufen gibt. Ausgehend von Ornithin und Arginin ist in Pflanzen der erste Schritt die Decarboxylierung der beiden Aminosäuren via Arginin- und Ornithindecarboxylase (ADC, ODC) zum Diamin Putrescin. Der Stoffwechselweg über die ADC besteht aus drei aufeinander folgenden enzymatischen Schritten. Zunächst erfolgt die Katalyse von L-Arginin mittels ADC zu Agmatin, nachfolgend die Umwandlung von Agmatin mittels Agmatiniminohydrolase zu N-Carbamoylputrescin und anschließend die Bildung von Putrescin durch die N-Carbamoylputrescinamidohydrolase. In der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* konnte kein Gen gefunden werden, welches für das Enzym ODC kodiert, so dass die Putrescinsynthese in dieser Pflanze ausschließlich über den ADC-Weg erfolgt (Hanfrey et al. 2001).

Der nächste Schritt in der Polyaminbiosynthese ist die Umwandlung von Putrescin zu Spermidin durch die Spermidinsynthase (SPDS). Die hierfür notwendigen Aminopropylgruppen werden durch die *S*-Adenosylmethionindecaboxylase aus *S*-Adenosylmethionin (SAM) erzeugt. Spermidin wird dann durch eine Sperminsynthase (SPMS) bzw. eine Thermosperminsynthase (TSPMS) in Spermin oder Thermospermin umgewandelt. Auch in diesem Schritt wird decarboxyliertes *S*-Adenosylmethionin als Aminopropyl-donor genutzt (Kusano et al. 2008, Liu et al. 2015, Alcázar et al. 2006, Abb. 2).

Die Oxidation der Polyamine kann über die kupferhaltige Aminoxidase (CuAO) sowie die Polyaminoxidase (PAO) erfolgen (Abb. 2), wobei erstere eine hohe Affinität für die Oxidation der primären Aminogruppen von Putrescin und Cadaverin aber eine geringe Affinität für Spermin und Spermidin besitzt (Moschou et al. 2012). Die Polyaminoxidase katalysiert die Oxidation der sekundären Aminogruppen von Spermin und Spermidin (Tavliadoraki et al. 2012). In beiden Fällen entsteht neben weiteren Reaktionsprodukten H_2O_2 (Tiburcio et al. 2014).

In Menschen und anderen Säugetieren führt ein Fehlen bzw. eine Reduzierung der Bildung von Spermin zu schwerwiegenden Defekten. Das Snyder-Robinson Syndrom, hervorgerufen durch eine Mutation im menschlichen *SPMS*-Gen, resultiert in einer reduzierten Sperminsynthaseaktivität und verursacht neben geistiger Behinderung auch Skelettdefekte, Hypotonie und Bewegungsstörungen. Sowohl in Menschen als auch in Mäusen ist das *SPMS*-Gen auf dem X-Chromosomen (Xp22.1 Region) lokalisiert. Der Versuch, transgene Knockout-Mäuse ohne *SPMS* zu erzeugen, führte zu nicht lebensfähigen Tieren (Ikeguchi et al. 2006).

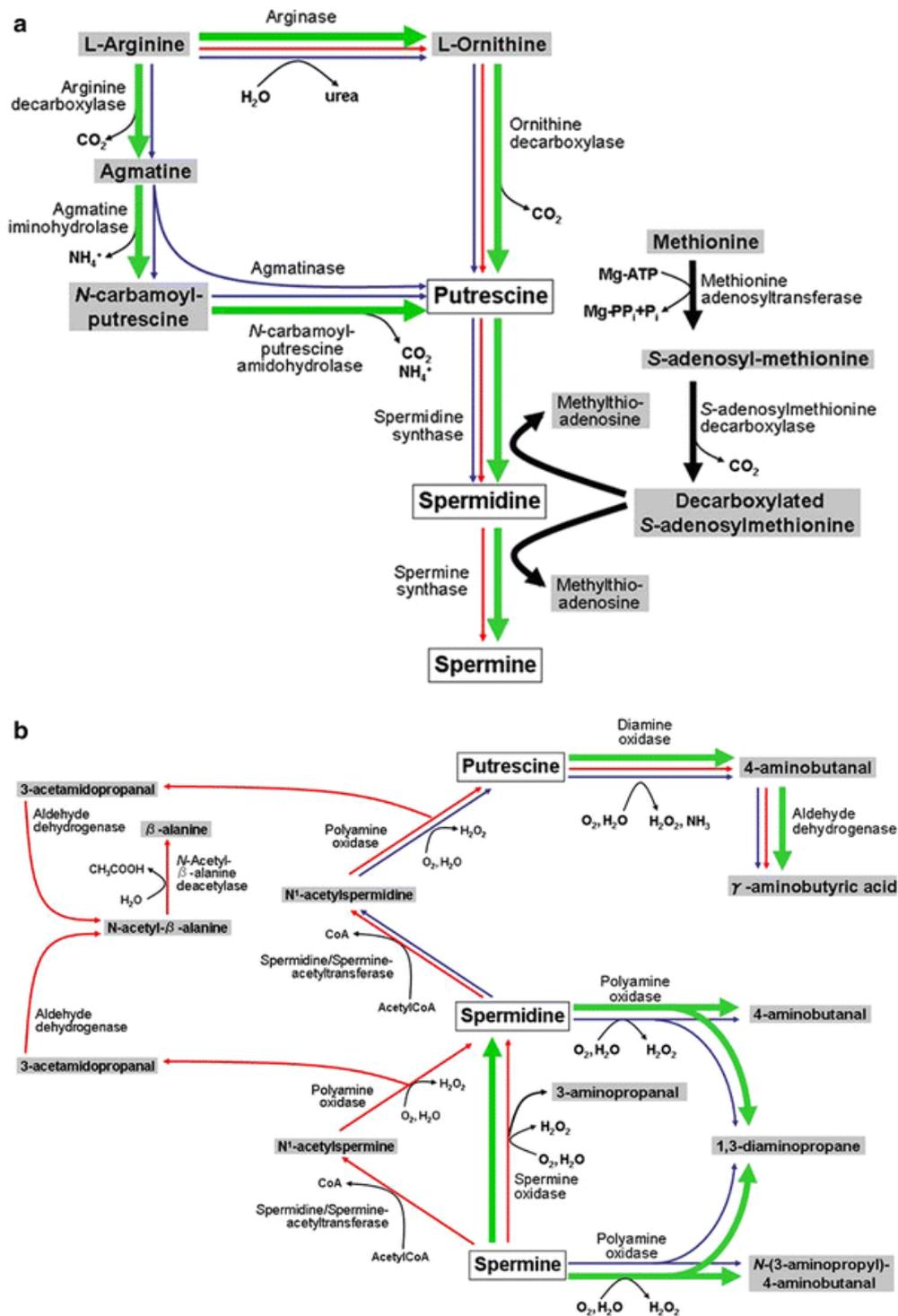


Abbildung 2: Biosynthese (A) und Abbau (B) von Polyaminen. Grüne Pfeile zeigen den pflanzlichen, blaue Pfeile den bakteriellen und rote Pfeile den tierischen Stoffwechselweg. Grafik aus Kusano et al. 2008.

1.6 Die Rolle von Spermin in der Stresstoleranz von Pflanzen

In Pflanzen wird Polyaminen eine Vielzahl von Funktionen während der Antwort auf biotischen und abiotischen Stress zugeordnet (Kusano et al. 2008; Alcázar et al. 2010). Änderungen der Polyaminkonzentration wurden während Trocken-, Salz- und Kältestress, sowie durch Belastung mit Schwermetallen oder UV-Strahlung nachgewiesen (Bouchereau et al. 1999; Alcázar et al. 2006; Groppa und Benavides 2008; Alcázar et al. 2010). In Gerste konnte nach einer Inokulation mit dem Pathogen *Blumeria graminis* eine Erhöhung der Polyamingehalte um bis zu 268% für Putrescin und 246% für Spermin nachgewiesen werden (Walters et al. 2003). Ausgelöst werden diese Veränderungen hauptsächlich durch eine angepasste Polyaminbiosynthese, aber auch durch die Oxidation von Polyaminen mittels Polyaminoxidasen. So stieg sowohl die Aktivität der ADC und ODC, als auch die der PAO und DAO in den mit *Blumeria graminis* befallenen Gerstepflanzen (Walters et al. 2003). Die Interaktion von Polyaminen mit pflanzlichen Hormonen wie ABA, sowie die Beteiligung von Polyaminen an verschiedensten molekularen Prozessen wird diskutiert. Hierzu zählen die Signalgebung über reaktive Sauerstoffspezien (ROS), die Beeinflussung von Ionenkanalaktivitäten, die Generierung von Stickstoffmonoxid (NO) oder die Ca^{2+} -Homöostase (Alcázar et al. 2010). Putrescin und Spermidin sind, nachgewiesen durch Knockout-Experimente, essentiell für Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*) und Pflanzen (Hamasaki-Katagiri et al. 1998; Imai et al. 2004b; Urano et al. 2005). So konnte in Arabidopsis *spds1-1 spds2-1* Doppelmutanten nach einer Phase des kontinuierlichen Wachstums der Keimblätter und der Achsenverlängerung keine weitere Entwicklung beobachtet werden. Spermidinsynthesen scheinen eine wesentliche Aufgabe in der Zellproliferation während der Embryogenese zu spielen. Ob die Lethalität allerdings bedingt ist durch das Fehlen der Spermidinsynthase oder einer Anhäufung des Polyamins Putrescin, bleibt offen. Auch das komplette Fehlen von Putrescin führt zu nicht lebensfähigen Pflanzen (Urano et al. 2005). Wird in Arabidopsispflanzen die Arginindecarboxylase überexprimiert, führt dies zu einer erhöhten Konzentration von Putrescin. Diese Pflanzen zeigen einen verminderten Wuchs und ein später einsetzendes Blühen, welches auf eine verminderte Gibberellinkonzentration zurückzuführen ist. Dies deutet darauf hin, dass ein, durch biotischen oder abiotischen Stress, erhöhter Putrescingehalt einen Einfluss auf den Gibberellinmetabolismus hat (Alcázar et al. 2005). Währenddessen führt das Fehlen von Spermin bei Pflanzen lediglich zu unterschiedlich ausgeprägten Funktionsstörungen, wie erhöhter Anfälligkeit gegen osmotischen Stress (Imai et al. 2004a). Spermin und Spermidin induzieren die Stickstoffmonoxidproduktion in Arabidopsis (Moschou et al. 2008). Die der Sperminproduktion zugrundeliegende Sperminsynthase zeigt in Experimenten zum Nachweis von stressinduzierten Genen eine deutlich erhöhte

Expression in stresstoleranteren Genotypen (Gonzalez et al. 2011). In transgenen Arabidopsispflanzen, welche die Sperminsynthase überexprimieren und damit eine erhöhte Konzentration von Spermin aufwiesen, konnten Gonzalez et al. (2011) zudem eine verbesserte Resistenz gegenüber dem Befall mit dem bakteriellen Pathogen *Pseudomonas viridiflava* beobachten. Im Weiteren konnten Yamaguchi und Kollegen (2006) zeigen, dass Knockoutpflanzen von *Arabidopsis thaliana*, deren Synthese von Spermin und Thermospermin inhibiert war, hochsensitiv auf Salzstress reagierten. Die Applikation von 1 mM Spermin konnte diese Sensitivität rückgängig machen, während die Zugabe von Thermospermin keinen Einfluss auf die Salztoleranz hatte. Thermospermindefiziente Arabidopsispflanzen zeigen allerdings einen verminderten Wuchs des Stängels, was darauf hindeutet, dass Thermospermin für die Entwicklung der Pflanze nötig ist (Kakehi et al. 2008). Zudem entwickeln diese Pflanzen dickere Blattadern, da es zu einer Zunahme von Gefäßzellen in den Blättern kommt (Clay und Nelson, 2005). Auch in Reis konnte durch die Überexpression von *SAMDC* bzw. *ADC* und einer dadurch erhöhten Konzentration von Spermin und Spermidin eine erhöhte Salzstresstoleranz (Roy und Wu 2002) oder Trockenstresstoleranz beobachtet werden (Capell et al. 2004). Einen weiteren Hinweis für eine Beteiligung von Spermin an Stresstoleranzmechanismen der Pflanze fanden Liu et al. (2004) an Weizen. Wurde bei einer trockenoleranten Weizensorte mit Polyethylenglykol (PEG) 6000 Trockenheit simuliert, konnte ein signifikanter Anstieg von freiem Spermin und Spermidin gemessen werden. In trocken sensitiven Weizen hingegen stieg nur der freie Putrescingehalt an.

Darüber hinaus gibt es viele Berichte, insbesondere aus der Tierphysiologie, dass vor allem Spermin mit funktionell unterschiedlichen Ionenkanälen und Rezeptoren interagiert (Williams et al. 1997). Damit zusammenhängend könnte die beschriebene Sensitivität von *Arabidopsis spms*-Knockoutmutanten gegenüber Trocken- und Salzstress dadurch erklärt werden, dass intrazelluläre Polyamine einwärts gerichtete Kaliumkanäle in der Plasmamembran von Schließzellen blockieren (Liu et al. 2000). Darüber hinaus zeigten Dobrovinskaya et al. (1999) in Gerste, dass Polyamine vakuoläre Kationenkanäle blockieren können.

1.7 Sperminsynthase als Produzent von Spermin in Pflanzen

Synthetisiert wird Spermin durch die Aminopropyltransferase Sperminsynthase, welche weit verbreitet ist und in Tieren, Pflanzen und Pilzen zu finden ist. Frühere Annahmen, dass es keine Sperminsynthase in Bakterien gibt, konnten widerlegt werden. *E. coli* und viele andere Bakterien enthalten nur Putrescin und Spermidin. Mittlerweile konnten aber zum Beispiel innerhalb einiger Actinobakterien sowie in Bakterien der Ordnungen

Clostridiales und *Bacilliales* Sperminsynthasen gefunden werden (Hamana und Matsuzak 1987; Hosoya et al. 2004). Während Spermidinsynthasen und Spermidin ubiquitär in Pilzen zu finden sind, hat die Sperminsynthase lediglich eine begrenzte Verbreitung innerhalb von Pilzen und wurde bisher nur in Hefe gefunden (Nickerson et al. 1977). Tierische und pflanzliche Zellen enthalten beide Aminopropyltransferasen, Spermidin- und Sperminsynthase. In Pflanzen scheint die Sperminsynthase auf die Bedecktsamer (Angiospermen) begrenzt zu sein. Pflanzliche Aminopropyltransferasen bestehen aus einer Gruppe von Enzymen, die eine Aminopropylgruppe auf einen Propylaminakzeptor übertragen. Als Donor verwenden Aminopropyltransferasen decarboxyliertes S-Adenosylmethionin. Während die Spermidinsynthase Putrescin als Akzeptor verwendet, um Spermidin zu produzieren, wird sowohl von der Sperminsynthase als auch der Thermosperminsynthase Spermidin als Akzeptor genutzt. Dadurch entsteht entweder Spermin oder Thermospermin. Die Lokalisation der Spermidin- und Sperminsynthasen konnte im Zytosol und im Nukleus von Pflanzenzellen beobachtet werden (Belda-Palazón et al. 2012). Die Sperminsynthase besitzt eine dimere Struktur, welche wahrscheinlich für die Aktivität wichtig ist. Zusätzlich ist eine N-terminale AdoMetDC-ähnliche Domäne mit möglicher zusätzlicher regulatorischer Funktion vorhanden (Pegg et al. 2009).

Neben den häufig beobachteten Polyaminen Putrescin, Spermidin und Spermin konnten auch andere Polyamine, wie Cadaverin oder Thermospermin, in lebenden Organismen gefunden werden. Thermospermin wurde erstmals in dem thermophilen Bakterium *Thermus thermophilus* entdeckt und später auch in *Halobacterium cutirubrum*, *Agrobacterium tumefaciens* oder in *Paracoccus denitrificans* nachgewiesen (Oshima 1979; Carteni-Farina et al. 1985; Hamana et al. 1989 und 1990). Thermospermin ist ein Strukturisomer von Spermin und wird aus Spermidin mittels Thermosperminsynthase synthetisiert. Beide Polyamine üben im Stoffwechsel unterschiedliche Funktionen aus und sprechen unterschiedlich auf biotischen und abiotischen Stress an (Mitsuya et al. 2009; Naka et al. 2010). Während zum Beispiel Thermospermin eine wichtige Rolle bei der Xylementwicklung in Pflanzen spielt, ist Spermin nicht essentiell für die Ausbildung des Phänotyps, wie Versuche mit *spms*-Mutanten in *Arabidopsis thaliana* zeigten (Imai et al. 2004b). Eine *acaulis5* (*acl5*)-Arabidopsismutante, welche kein Thermospermin produziert, wurde erstmals 1997 durch Hanzawa und Kollegen isoliert, und es wurde gezeigt, dass ein Fehlen von Thermospermin zu einer verminderten Ausbildung des Sprosses führte.

1.8 Hypothesen und Ziele dieser Arbeit

In der Literatur konnte an verschiedenen Pflanzen bereits gezeigt werden, dass Polyamine in Verbindung mit verbesserter Toleranz gegenüber abiotischen Stressfaktoren wie zum Beispiel Trockenheit stehen. Bezugnehmend auf Arbeiten an *Arabidopsis* (Alcázar et al. 2006, Yamaguchi et al. 2006) wurde zu Beginn dieser Arbeit postuliert, dass Polyamine auch in der monokotyledonen Pflanze Gerste einen positiven Einfluss auf die Trockenstresstoleranz haben könnten. In der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* reagierten vor allem Sperminmangel-Mutanten hypersensitiv auf Trockenstress und erhöhte Salzkonzentrationen im Boden. Daher ist ein Ziel dieser Arbeit, die Rolle des Polyamins Spermin während Trockenstress in Gerste zu untersuchen. Dazu sollten putative Sperminsynthasen in Gerste gefunden und deren Rolle unter Trockenstress durch Expressionsanalysen und in pharmakologischen Ansätzen untersucht werden. (Abb 3. (I)). Da sich ABA und Spermin gegenseitig beeinflussen könnten und damit beide die Ca^{2+} -abhängige Signaltransduktion modulieren würden, sollte im Weiteren die mögliche Veränderung der $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ durch Spermin in unterschiedlichen Pflanzenteilen der Gerste bestimmt werden (Abb. 3 (II)). In einem weiteren Ansatz sollte in Stomataversuchen geklärt werden, ob es einen tatsächlichen Zusammenhang zwischen Spermin und ABA sowie der $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ auf die Salz- und/oder Trockentoleranz der Gerste gibt (Abb. 3 (III)).

Zum Erreichen der genannten Ziele wurden $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ -Messungen an gesamten Pflanzen und an einzelnen Pflanzenteilen durchgeführt. Dazu sollten unterschiedliche Analysemethoden, basierend auf den Reporterproteinen Aequorin und Yellow Cameleon 3.6 (YC 3.6) eingesetzt werden. Der Nachweis des Einflusses der Polyamine, insbesondere von Spermin, auf die Stresstoleranz der Gerste sollte in hydroponischen Versuchen geklärt werden. Der Einfluss auf den Stomataschluss sollte mittels Bioassays an einzelnen Schließzellen untersucht werden.

Um die Grundlagen der Biosynthese und Wirkung von Spermin in Gerste zu analysieren, sollten daneben mögliche Sperminsynthasen in Gerste charakterisiert werden. Hierzu sollten transgene Gerstenpflanzen erstellt werden, anhand deren in Folgeprojekten geprüft werden sollte, ob die Stresstoleranz von Gerste durch Erhöhung der Sperminkonzentration verbessert bzw. durch deren Verringerung reduziert wird.

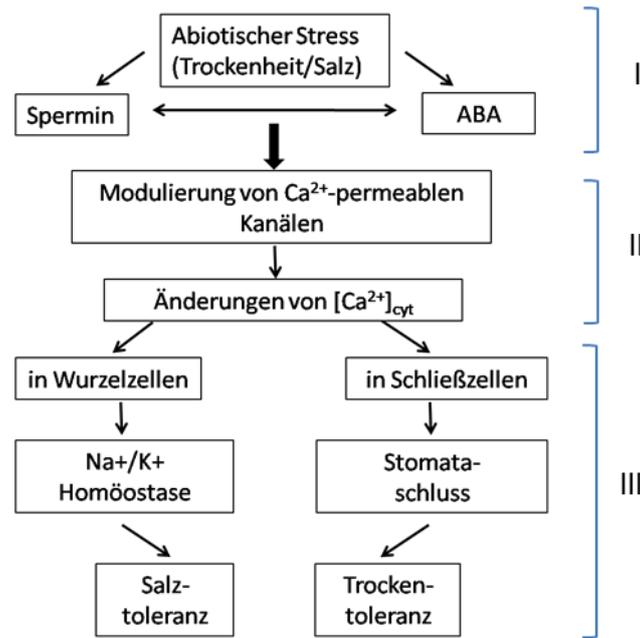


Abbildung 3: Hypothese zur Einflussnahme von Spermin auf die abiotische Stresstoleranz von Gerste. I - Einfluss von Spermin auf abiotischen Stress, II - Einfluss von Spermin auf [Ca²⁺]_{cyt}, III - Einfluss von Spermin auf die Trocken- und Salzstresstoleranz

2 Material und Methoden

2.1 Software und Datenbanken

Zur Erstellung dieser Arbeit wurden folgende Datenbanken, Internetdienste und im Internet verfügbare Programme verwendet:

- ◆ BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) gegen die NCBI (*National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine*) Datenbanken (Altschul et al., 1990 & 1997) diente dem Vergleich von Protein- oder Nukleotidsequenzen mit homologen Genen, Proteinen oder ESTs (*expressed sequence tags*).

<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

- ◆ Multalin (*Multiple sequence alignment with hierarchical clustering*) (Corpet, 1988) wurde für den Vergleich von mehreren Sequenzen genutzt.

<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin>

- ◆ Das Programm MEGA5 (Tamura et. al, 2011) wurde zur Erstellung von Stammbäumen angewendet.
- ◆ Die *Prosite*-Datenbank (Falquet et al. 2002) wurde zum Auffinden konservierter Motive in den Proteinsequenzen verwendet.

<http://www.expasy.org/tools/scanprosite>

- ◆ Zum Übersetzen einer Nukleotidsequenz in die entsprechende Proteinsequenz wurde das *Emboss Transeq Tool* (EMBL-EBI 2015) benutzt.

http://www.ebi.ac.uk/Tools/st/emboss_transeq

- ◆ Unter Verwendung von Primer3 (Rozen et al., 2000) wurden Oligonukleotid-Primer entworfen.

<http://primer3.ut.ee/>

- ◆ Das Programm Webcutter 2.0 wurde zum Auffinden möglicher Schnittstellen von Restriktionsendonukleasen in Nukleotidsequenzen genutzt.

<http://rna.lundberg.gu.se/cutter2>

- ◆ Die Suche nach SPMS Sequenzen in Gerste ermöglichten folgende Datenbanken:

- o *Barley1*-Datenbank (Shen et al. 2005)
<http://www.plexdb.org/plex.php?database=Barley>
- o GabiPD (GABI-Primärdatenbank am Max-Planck-Institut für Molekulare Pflanzenphysiologie, Potsdam)
<https://www.gabipd.org>
- o *The IPK Crop EST Database* (Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK), Gatersleben)
<http://pgrc.ipk-gatersleben.de/est>

2.2 Materialien

2.2.1 Chemikalien, Enzyme und Kits

Chemikalien, Enzyme und Kits mit Daten von Herstellern und Katalognummer sind im Anhang dargestellt (Anhang, Tab. 2, 4, 5)

2.2.2 Oligonukleotide

Alle verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland) hergestellt und sind im Anhang aufgelistet (Anhang, Tab. 7)

2.2.3 Pflanzen

Die Versuche der vorliegenden Arbeit wurden mit *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. sowie mit *Hordeum vulgare* cv. Golden Promise, cv. Tadmor und cv. Scarlett durchgeführt. Neben dem Wildtyp der beiden Pflanzen wurde zudem mit transgenen Linien gearbeitet, welche in den betreffenden Kapiteln jeweils noch einmal genannt werden.

2.3 Anzuchtmethoden

2.3.1 Bakterienanzucht

Für die Herstellung von Plasmidkonstrukten wurde der *Escherichia coli* Stamm E10 (Invitrogen, Darmstadt, Deutschland) verwendet. *E. coli* wurde in Terrific Broth (TB) oder Luria-Bertani Medium (LB) mit entsprechender Selektion über Nacht bei 37°C kultiviert. *Agrobacterium tumefaciens* Stämme wurden in Yeast Extract Broth (YEB) bzw. in *Agrobacterium* Minimal Medium (AB) für 2 Tage bei 28°C ebenfalls mit entsprechender Selektion kultiviert. Eine Übersicht über die jeweiligen Selektionsantibiotika ist in Tabelle 6 (Anhang) angegeben.

2.3.2 Anzucht von *Arabidopsis thaliana* auf Erde

Arabidopsispflanzen wurden in einem Gemisch aus Einheitserde ED73 (Einheitserde Werkverband, Sinntal-Altengronau, Deutschland) und Vermiculit (Kammlott, Erfurt, Deutschland) im Verhältnis 2:1 (v/v) kultiviert. Außerdem wurde dem Erde/Vermiculit-Gemisch Biomükk (Eco Bio Systems, Tönisvorst, Deutschland) nach Herstellerangaben zugesetzt, um einem möglichen Befall mit Trauermücken vorzubeugen. Arabidopsis-Samen wurden direkt auf die Erde gesät und zwei Tage bei 4°C im Dunkeln stratifiziert. Die Anzucht erfolgte in einem Klimaschrank (AR75, Percival Scientific, Perry, IA, USA) bei einer Lichtintensität während der Tagesperiode (16 h) von 100-150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Die Temperatur betrug 22°C am Tag und 18°C in der Nacht; die relative Luftfeuchtigkeit betrug 65%.

2.3.3 Anzucht von *Arabidopsis thaliana* in Hydrokultur

Arabidopsis-Samen wurden zunächst eine Minute mit 70% Ethanol und anschließend fünf Minuten mit Hypochloritlösung (4% NaClO; 0,02% Triton X-100) gewaschen. Es folgten vier Waschschriffe mit sterilem deionisiertem Wasser. Anschließend wurden die Samen in 24-Lochplatten mit halbkonzentriertem Murashige & Skoog – Medium ($1/2$ -MS-Medium, pH 5,8), welches 0,25 g /L Saccharose enthält, überführt. Zum Stratifizieren wurden die mit Parafilm verschlossenen Platten in Aluminiumfolie gewickelt und für zwei Tage bei 4°C dunkel inkubiert. Im Anschluss wurden die Platten aus der Aluminiumfolie genommen. Die Kultivierung der gekeimten Pflanzen erfolgte unter Langtagbedingungen in einem Klimaschrank (AR75, Percival Scientific) mit 16 h Licht / 8 h Dunkelheit bei 22°C und 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Die relative Luftfeuchte im Pflanzenschrank betrug 65%.

2.3.4 Anzucht von *Hordeum vulgare* auf Erde

Die Gerstenpflanzen wurden für die Versuche soweit nicht anders angegeben in Kunststofftöpfen mit einem Durchmesser von 24 cm und einem Volumen von 5,4 l kultiviert. In die Töpfe wurde 2 kg Einheitserde ED73 gemischt mit Perlit (Verhältnis 3:1 v/v) gefüllt. Samen der zweizeiligen Sommergerstensorte Golden Promise wurden zunächst für drei Stunden in einer 1 mM CaSO_4 -Lösung inkubiert, danach für zwei Tage bei 4°C stratifiziert und anschließend rund 2 cm tief in Erde ausgesät. Pro Topf wurden jeweils 3 Samen ausgesät. Alle zwei Tage wurde bis zur maximalen Wasserkapazität gewässert; überschüssiges Wasser konnte abfließen. Die Düngung erfolgte mit einem NPK-Flüssigdünger (WUXAL NPK 8-8-6, Wilhelm Haug, Ammersbach, Deutschland) und wurde ab sechs Wochen nach der Keimung alle zwei Wochen durchgeführt. Dabei wurden pro Topf 100 ml einer Lösung von 2 ml Flüssigdünger $\text{l}^{-1} \text{H}_2\text{O}$ gegossen. Die Pflanzen wurden in einem Klimaschrank (AR75, Percival Scientific) oder, zur Anzucht von Spenderpflanzen zur Herstellung transgener Gerstenpflanzen, in einer begehbaren

Klimakammer (Siemens, München) kultiviert. Die Beleuchtung hatte eine Intensität von 600-700 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ mit einem Tag-Nachtrhythmus von 16 zu 8 h. Die Temperatur betrug 18°C am Tag und 14°C in der Nacht; die relative Luftfeuchtigkeit betrug 65%. Die spätere Kultivierung der transformierten Pflanzen erfolgte in klimatisierten Gewächshauskammern unter vergleichbaren, aber weniger eng kontrollierbaren Wachstumsbedingungen mit automatischer Bewässerung.

2.3.5 Anzucht von *Hordeum vulgare* in Hydrokultur

Zur Anzucht der Gerstenpflanzen für die Versuche in Hydrokultur wurden die Samen drei Stunden in einer 1 mM CaSO_4 -Lösung vorgequollen, anschließend zwei Tage bei 4°C stratifiziert, und dann auf mit Wasser angefeuchtetem Papier bei Raumtemperatur im Dunkeln zum Keimen gebracht. Drei Tage nach erfolgter Keimung erfolgte der Transfer in die mit 1,2 L Nährlösung (Anhang Tab. 8) gefüllten und mit einer Belüftung versehenen Hydrokulturgefäße. In einem Gefäß befanden sich jeweils 9 Pflanzen. Um Toxizitätserscheinungen zu verhindern, wurde die Nährlösung zunächst $\frac{1}{2}$ -konzentriert angesetzt und nach drei Tagen gegen unverdünntes Medium ausgetauscht. Um eine möglichst konstante Nährstoffverfügbarkeit zu gewährleisten, wurde das Medium nach weiteren drei Tagen gewechselt. Nach einwöchigem Wachstum der Pflanzen auf unverdünntem Medium wurden PEG 6000 bzw. NaCl zugesetzt. NaCl wurde in einer Konzentration von 50 mM, 100 mM bzw. 150 mM zugegeben. Für die PEG-Konzentration wurden isoosmotische Bedingungen zu den jeweiligen osmotischen Potenzialen der entsprechenden NaCl-Lösungen mittels Osmometer bestimmt. Somit ergaben sich Endkonzentrationen für das PEG 6000 von 8%, 14,8% bzw. 16%. Vierzehn Tage nach Zugabe von NaCl und PEG erfolgte die Ernte der Gerstenpflanzen. Spross- und Wurzelsystemlänge wurden durch Bestimmung der Länge der längsten Wurzel bis zum Beginn des jüngsten Blattes gemessen. Die Bestimmung der Trockenmasse von Spross und Wurzel erfolgte nach zwölfstündiger Trocknung der Pflanzenteile bis zur Gewichtskonstanz im Trockenschrank bei 90°C.

2.4 Molekularbiologische Methoden

2.4.1 RNA-Extraktion

Die Expression der Sperminsynthase-codierenden Gene wurde in Blättern und Halm von Gerste untersucht. Die Ernte erfolgte drei Tage nach Keimung der Samen und danach im 14-tägigen Rhythmus. Das Pflanzenmaterial für alle anderen Versuche bestand aus Blättern und wurde entsprechend dem Versuchsziel zu den angegebenen Zeiten geerntet. Zur Isolierung von RNA wurde das zu untersuchende Pflanzenmaterial

geerntet und in flüssigem Stickstoff gemörsert. 100 mg des gemörserten Pflanzenmaterials wurden in 1,5 ml Reaktionsgefäße abgewogen, und die Gesamt-RNA wurde mit dem Spectrum Plant Total RNA Kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) nach Angaben des Herstellers isoliert. Die erhaltene RNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Die Quantifizierung der Nukleinsäuren erfolgte mit Hilfe eines Mikroliter-Spektralphotometers (Nanodrop ND-2000c, ThermoFisher, Henningsdorf, Deutschland).

2.4.2 Reverse Transkription

Die cDNA-Synthese erfolgte unter Verwendung der reversen Transkriptase SuperScript II (ThermoFisher). Bei Nutzung der cDNA zur Amplifikation von Fragmenten für Klonierungsexperimente wurden 2 μl Oligo-dT₂₄-Primer (50 μM) und 1 μl dNTPs (je 10 mM) zusammen mit 1-2 μg Gesamt-RNA in ein steriles PCR-Reaktionsgefäß gegeben und mit sterilem, deionisiertem Wasser auf 12 μl aufgefüllt. Das Gefäß wurde 5 Minuten bei 65°C inkubiert und dann sofort auf Eis gestellt. Jeweils 4 μl des 5x First Strand Buffer (Thermo Fisher), 1 μl DTT (0.1 M) und 1 μl RNaseOUT (ThermoFisher) wurden dem Reaktionsgefäß zugegeben. Nachdem die Proben geschüttelt und kurz an zentrifugiert wurden, erfolgte eine zweiminütige Inkubation bei 42°C . Ein μl der reversen Transkriptase (200 Units) wurde hinzugegeben. Danach folgten zwei Inkubationsschritte, 90 Minuten bei 65°C , danach 15 Minuten bei 70°C . Zur Reaktion wurde dann 1 μl RNase A gegeben, und die Reaktion wurde 20 min bei 37°C inkubiert. Zum Schluss wurde 29 μl deionisiertes Wasser zugegeben und die erhaltene cDNA entweder sofort weiterverwendet oder bei -20°C aufbewahrt. Sollte die cDNA für quantitative Analysen genutzt werden, wurde statt der Reversen Transkriptase SuperScript II und Oligo-dT₂₄-Primern die Reverse Transkriptase M-MuLV (ThermoFisher) und dN₆-Primer verwendet. Auch hier erfolgte die Synthese nach Herstellerangaben des Kits.

2.4.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur Amplifizierung der cDNA von *HvSPMS1* und *HvSPMS2* wurden 2,5 μl des RT-Ansatzes in einer Standard-PCR-Reaktion nach Herstellerangaben eingesetzt. Die Annealingtemperatur wurde an die verwendeten Primer angepasst (siehe Anhang Tab. 7).

H ₂ O	31,0 µl
5x Phusion HF Puffer	10,0 µl
10 mM dNTPs	1,0 µl
10 µM Vorwärts-Primer	2,5 µl
10 µM Rückwärts-Primer	2,5 µl
cDNA	2,5 µl
<u>Phusion hot start DNA Polymerase</u>	<u>0,5 µl</u>
Gesamt	50,0 µl

Die PCR-Reaktionen wurden in einem Thermocycler (Biometra, Göttingen, Deutschland) mit folgenden Parametern durchgeführt.

Schritt	Prozess	Zeit	Temperatur
1	initiale Denaturierung	30 sec	98°C
2-31	Denaturierung	10 sec	98°C
	Annealing	30 sec	T _m - 5°C
	Elongation	1 min kb ⁻¹	72°C
32	finale Elongation	5 min	72°C

2.4.4 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Analyse der DNA-Proben aus der PCR wurde ein 1%-iges (1 g L⁻¹) Gel aus Agarose in TAE-Puffer (40 mM Tris, 20 mM Essigsäure, 1 mM EDTA) hergestellt. Das Gel wurde in der Mikrowelle erhitzt und mit 0,02 µl *SybrSafe DNA Gel Stain* (ThermoFisher) pro ml Gel versetzt. Die Ansätze aus der PCR wurden zunächst mit einem 6x Probenpuffer (30% (v/v) Glycerin, 0,25% (0,25 g L⁻¹) Bromphenolblau) versetzt und dann je 10 µl auf das Gel aufgetragen. Bei konstanter Spannung von 100 V wurden die einzelnen Fragmente durch Gelelektrophorese aufgetrennt. Um die Größe der DNA-Fragmente zu analysieren, wurde ein 1 kb-Marker (New England Biolabs) verwendet.

2.4.5 Isolierung und Reinigung von DNA aus Agarosegelen

Die Aufreinigung des PCR-Produkts, welches mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten wurde, erfolgte mittels eines Kits (*Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System*; Promega, Madison, USA) nach Herstellerangaben. Die gereinigte DNA wurde entweder sofort weiterverwendet oder bei -20 °C aufbewahrt.

2.4.6 A-Tailing

Die Vollängen-DNA-Fragmente wurden in den Plasmidvektor *pGEM-T* (Promega) mittels TA-Klonierung eingefügt. Hierzu wurde zunächst mit folgender Reaktion ein A-Überhang an das Fragment angefügt:

PCR-Produkt	7,5 µl
4 mM dATP (final 0.2 mM)	0,5 µl
10 x Taq-Puffer	1,0 µl
<u>Taq (Homemade)</u>	<u>1,0 µl</u>
Total	10 µl

Die Inkubation wurde für 20 min bei 72°C in einem PCR-Thermocycler durchgeführt. Die Ligation erfolgte unmittelbar danach, um einen Verlust des A-Überhanges zu vermeiden.

2.4.7 Ligation

Die Ligation des Vektors mit dem Insert wurde in einem sterilen Eppendorfgefäß durchgeführt. Es wurden 100 ng Vektor eingesetzt.

Ligationsansatz:

Ligase Puffer	2 µl
Vektor (100 ng)	µl
Insert (* ng)	µl
<u>T4 DNA Ligase</u>	<u>1 µl</u>
Mit Wasser auffüllen auf	20 µl

*: $\text{ng Insert} = (100 \text{ ng Vektor} \times 1580 \text{ bp (Länge des cDNA Inserts)} / 5500 \text{ bp (Länge des Vektors)}) \times 3$

Die Inkubation erfolgte über Nacht bei Raumtemperatur oder für mehrere Tage bei 4°C. Kurz vor der Transformation wurde die Reaktion durch eine zehnmütige Inkubation bei 65°C gestoppt.

2.4.8 Transformation elektrisch kompetenter Zellen

Die Transformation von *E. coli* erfolgte mit Hilfe eines Elektroporators (2510, Eppendorf, Hamburg, Deutschland). Für jede Transformation wurden 2 µl des Ligationsansatzes (entsprechend 20 ng Plasmid-DNA) verwendet. Diese wurden mit 60 µl kompetenter

Bakterienzellen gemischt und vorsichtig in eine eisgekühlte Elektroporationsküvette (2 mm Elektrodenabstand, PEQLAB, Erlangen, Deutschland) pipettiert. Die Transformation wurde bei 2500 V durchgeführt. Anschließend wurden sofort 400 µl SOC-Medium (Anhang Tab. 10) in die Küvette gegeben. Die Bakteriensuspension wurde danach in ein Reaktionsgefäß überführt und eine Stunde bei 37°C (*A. tumefaciens* für 2 h bei 28°C) und 200 U min⁻¹ in einem Inkubator kultiviert. Nach der Vorinkubation wurden die Bakterien auf einer Agarplatte mit LB-Medium (für *E. coli*, 50 µg ml⁻¹ Ampicillin, Anhang Tab. 9) bzw. einer YEB-Platte (für *A. tumefaciens*, Anhang Tab. 12) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C (*E. coli*) bzw. 28°C (*A. tumefaciens*) inkubiert.

2.4.9 Kolonie-PCR

Zum Nachweis der erfolgreichen Transformation wurde eine Kolonie-PCR durchgeführt, für die die Bakterienkolonien einen Tag nach dem Ausstreichen direkt im PCR-Ansatz verwendet wurden. Hierfür wurden Primer genutzt, die jeweils an den Vektor und das Insert binden. Der PCR-Ansatz wurde nach Angaben des Herstellers (Go Taq DNA Polymerase, Promega) durchgeführt. Die Annealingtemperatur wurde an die verwendeten Primer angepasst (Anhang Tab. 7).

2.4.10 Aufreinigung von Plasmiden

Durch die Kolonie-PCR konnten erfolgreich transformierte Kolonien identifiziert werden. Diese wurden in flüssiges LB-Medium überführt und über Nacht bei 37°C schüttelnd inkubiert. Die Plasmid-DNA wurde anschließend mit Hilfe des *Wizard Plus SV Miniprep Purification Kit* (Promega) nach Herstellerangaben aufgereinigt und deren Konzentration am Nanodrop-Spektralphotometer gemessen.

Zur Gewinnung größerer Mengen an Plasmid-DNA wurden Plasmidkonstrukte mit der gewünschten Insertion aus Flüssigkulturen mit dem Midiprep-Kit Nucleo Bond Xtra (Macherey-Nagel, Berlin, Deutschland) nach Herstellerangaben gereinigt.

2.4.11 Restriktionsverdau

Ein Restriktionsverdau von isolierter Plasmid-DNA oder PCR-Fragmenten und Vektor erfolgte nach Herstellerangaben der jeweils genutzten Restriktionsenzyme unter Verwendung des empfohlenen Puffers und der beschriebenen Reaktionsbedingungen. Die verwendeten Enzyme sind in Tab. 4 im Anhang aufgelistet. Die Isolierung der verdauten DNA-Fragmente erfolgte anschließend über eine Agarosegelelektrophorese wie in Kapitel 2.4.4 beschrieben. Die Isolierung und Reinigung erfolgte mittels *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega) wie beschrieben in 2.4.5.

2.4.12 Dephosphorylierung

Zur Dephosphorylierung wurden 30 µl Plasmid-DNA mit 3,5 µl 10x TSAP-Puffer und 2 µl TSAP (Thermosensitive Alkaline Phosphatase, Promega) gemischt. Die Reaktion erfolgte bei 37°C für 15 min und bei 74°C für weitere 15 min. Die dephosphorylierte DNA wurde mittels Kit (*Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System*, Promega) aufgereinigt.

2.4.13 Sequenzierung

Zur Sequenzierung nach Sanger et al. (1977) wurde das *BigDye Sequenzier-Kit* (ABI PRISM BigDye Terminator V1.1 Cycle) eingesetzt (Platt et al. 2007).

Sequenzier-Reaktion:

5x Puffer	2,0 µl
Plasmid (200 ng)	µl
3,2 µM Primer	2,0 µl
<u>Big Dye</u>	<u>0,5 µl</u>
Mit Wasser auffüllen auf	10,0µl

Die Amplifikation der DNA wurde in einem TPersonal Thermocycler (Biometra, Göttingen, Deutschland) nach der Methode von Platt et al. 2007 durchgeführt. Im Anschluss an die Sequenzier-Reaktion erfolgte die Fällung der DNA. Dafür wurden 10 µl des PCR-Produkts mit 1 µl EDTA (125 mM, pH 8), 1 µl Na-Acetat (3 M) und 25 µl Ethanol (100%) für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die gefällte DNA 45 Minuten bei 14000 U min⁻¹ und 4°C zentrifugiert (5415R, Eppendorf). Das Pellet wurde mit 60 µl Ethanol (70%) gewaschen und erneut bei 14000 U min⁻¹ und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet bei 80°C zehn Minuten getrocknet. Die Ergebnisse der elektrophoretischen Auftrennung der Fluoreszenzfarbstoff-markierten DNA-Proben konnten mittels der Software *Sequence Scanner v1.0* (Life Technologies, Darmstadt, Deutschland) ausgewertet werden.

2.4.14 Generierung der *HvSPMS1*- und *HvSPMS2*- Überexpressionskonstrukte

Zur Überexpression der Gene *HvSPMS1* und *HvSPMS2* wurde deren kodierende Region aus Gerste-cDNA amplifiziert und in den Vektor pUbi-AB (DNA Cloning Service, Hamburg, Deutschland) kloniert. Der Vektor und das amplifizierte Fragment wurden mit *BamHI-HF* (NEB) verdaut und wie oben beschrieben aufgereinigt, dephosphoryliert und ligiert. Die jeweiligen Expressionskassetten wurden dann in die *SfiI*-Schnittstelle des

binären Vektors pLH7000 (DNA Cloning Service) subkloniert (Abb. 4) und die vorbereiteten Agrobakterien wie in 2.4.8 beschrieben damit transformiert.

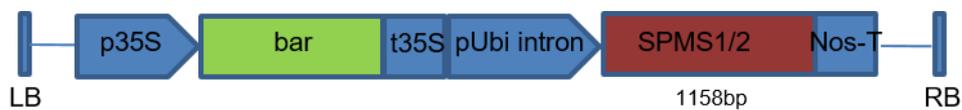


Abbildung 4: Konstrukt für die Überexpression von *HvSPMS1* und *HvSPMS2*. LB und RB: Linke und rechte Grenzsequenz; p35S und t35S: 35S-Promotor bzw. -Terminator des Blumenkohlmosaikvirus; bar: Phosphinotricin-Acyltransferase (Basta-Resistenz); SPMS1/2: *SPMS1* oder *SPMS2* cDNA; Nos-T: Terminator der Nopalinsynthetase.

2.4.15 Generierung der *HvSPMS1*- und *HvSPMS2*-RNAi-Konstrukte

Für die RNAi-Konstrukte wurde zunächst ein 201 bp bzw. 125 bp großes Fragment der cDNA von *HvSPMS1* bzw. *HvSPMS2* mit Primern für die Restriktionschnittstellen *Bam*HI/*Asc*HI (RNAi-antisense) bzw. *Spe*I/*Kpn*I (RNAi-sense) in einer PCR (2.4.3) amplifiziert und über die eingefügten Schnittstellen in den Vektor pStarling (<http://www.pi.csiro.au/rnai/vectors.htm#pSTAR>) kloniert. Der Vektor wurde anschließend mit *Hind*III verdaut, und die gesamte Expressionskassette wurde in den Vektor pUbi-AB kloniert. Danach erfolgte ein Restriktionsverdau des pUBI-AB-SPMS-RNAi Vektors mit *Sfi*I, und die gesamte Expressionskassette wurde in den binären Vektor pLH7000 kloniert (Abb. 5).

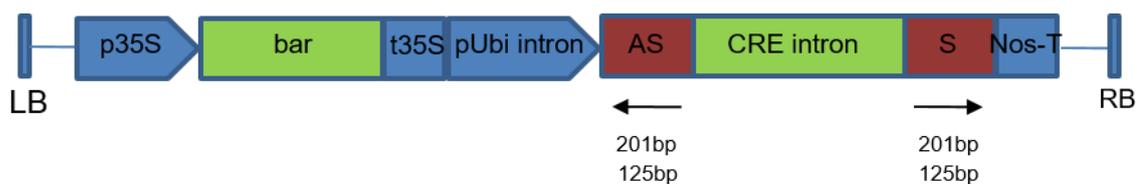


Abbildung 5: RNAi-Konstrukt für die Suppression der Expression von *HvSPMS1* und *HvSPMS2*. LB und RB: Linke und rechte Grenzsequenz; p35S und t35S: 35S-Promotor bzw. -Terminator des Blumenkohlmosaikvirus; bar: Phosphinotricin-Acyltransferase (Basta-Resistenz); AS: antisense-*SPMS1/2* (Konstrukt 1: 201 bp, Konstrukt 2: 125 bp); S: sense-*SPMS1/2* (Konstrukt 1: 201 bp, Konstrukt 2: 125 bp); CRE intron: verbindet Antisense- und Sense-Sequenzen; Nos-T: Terminator der Nopalinsynthetase.

2.4.16 *Agrobacterium tumefaciens*-vermittelte Transformation von Gerste

Folgende Medien wurden verwendet:

- Kulturmedien für Bakterien: YEB, LB, SOC
- Kulturmedien für Pflanzengewebe:
 1. Kallusinduktion ohne Antibiotika (C-)
 2. Kallusinduktion mit Antibiotika (C+)
 3. Übergangsmedium (Sprossinduktion) (T)
 4. Regenerationsmedium (Wurzelinduktion) (R)

Eine Auflistung aller verwendeten Medien findet sich im Anhang (Tab. 9-14).

2.4.16.1 Ernte und Isolierung unreifer Gersteembryonen

Die Ernte unreifer Körner erfolgte 12-14 Tage nach der Anthese (EC Stadium 69). Zunächst wurden zwischen 10 und 12 Ähren geerntet und 100 unreife, noch grüne Körner gesammelt. Hierbei wurden nur Körner aus der Mitte der Ähre genutzt. Die Sterilisation der Körner erfolgte durch fünfminütiges Schütteln in 70%-igem Ethanol. Nach dem Abgießen des Ethanols über ein Sieb wurden die Körner mittels 3% NaOCl (3 g L^{-1}) und einem Tropfen Tween20 für 20 min weiter sterilisiert. Nachdem die Lösung erneut mit Hilfe eines Siebes entfernt wurde, erfolgte eine Neutralisation mit sterilem Wasser, dessen pH-Wert zuvor mit 1M HCl auf 3,0 eingestellt wurde. Nach erneutem Entfernen der Lösung wurde weitere zweimal mit Wasser gespült und die sterilisierten Gerstenkörner anschließend auf Eis aufbewahrt. Alle weiteren Schritte erfolgten unter sterilen Bedingungen in einer Sterilbank. Zwanzig sterile Gerstenkörner wurden auf eine sterile Petrischale gegeben und mit Hilfe eines Stereomikroskops (Stemi SV11; Carl Zeiss, Jena, Deutschland) mittels Skalpell und Pinzette aufgeschnitten. Die embryonale Achse wurde entfernt. Der so präparierte unreife Embryo wurde auf eine Petrischale mit Induktionsmedium zur Kallusbildung gelegt, so dass das Scutellum nach oben zeigte (Abb. 6).

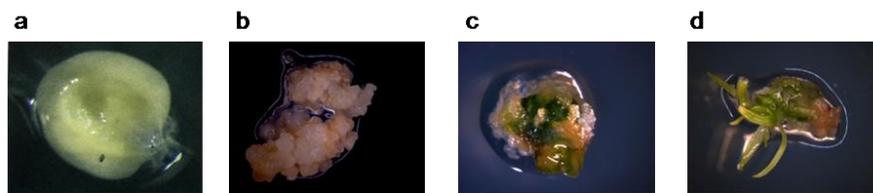


Abbildung 6: Ablauf der Gerstentransformation. Präparation des Scutellums und Bildung von Spross und Wurzel aus transformiertem Kallus mittels unterschiedlichen Kulturmedien. a: Scutellum, b: Kallusbildung aus transformiertem Scutellum, c: Ergrünen des Kallus, d: Sprossbildung aus transformiertem Kallus

2.4.16.2 Vorbereitung und Transformation der Agrobakterien

Zunächst erfolgte eine Kultivierung der Bakterien (*Agrobacterium tumefaciens*, Stamm ABL) bei 28°C über Nacht in 100 ml LB-Medium mit 25 µg ml⁻¹ Rifampicin und 25 µg ml⁻¹ Carbenicillin in einem Erlenmeyer-Kolben, der mit 200 U min⁻¹ geschüttelt wurde. Danach erfolgte eine Zugabe von weiteren 300 ml LB-Medium, und die Bakterien wurden für 4 h bei 200 U min⁻¹ geschüttelt. Die Vorkultur wurde bis zu einer OD₆₀₀ von 0,3-0,5 wachsen gelassen. Anschließend wurde die Bakterienkultur 20 min auf Eis gelagert, in ein 500 ml Zentrifugationsgefäß überführt und 15 min bei 4000 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das verbliebene Pellet in 400 ml eiskaltem Wasser resuspendiert und erneut für 15 min bei 4000 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde wiederum verworfen und das Pellet in 30 ml eiskaltem Wasser resuspendiert, in eine Blaudeckelflasche überführt und mit 50 ml eiskaltem Wasser aufgefüllt. Anschließend wurde wie beschrieben 4-6-mal mit 50 ml eiskaltem Wasser und abschließend mit 50 ml 10%-igem Glycerin gewaschen. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 2 ml 10%-igem Glycerin resuspendiert. Daraus wurden 60µl-Aliquots in 1.5 ml Eppendorf-Gefäße abgefüllt. Die Aufbewahrung bis zur weiteren Nutzung erfolgte bei -80°C.

Für die Transformation wurden 0,5 µl Plasmid-DNA zu 50 µl der aliquotierten Agrobaktériensuspension pipettiert. Diese Lösung wurde geschüttelt und ohne Blasenbildung in Elektroporationsküvetten transferiert (2 mm Elektrodenabstand, PEQLAB, Erlangen, Deutschland). Nach der Elektroporation bei 2500 V wurde die Küvette entnommen, und es wurden sofort 300 µL SOC-Medium zugegeben. Die Bakteriensuspension wurde in 2 ml Eppendorfgefäße überführt und 2 h bei 28°C und 100-200 U min⁻¹ inkubiert. Je 50 µl der transformierten Agrobakterien wurden auf eine YEB-Platte ausgestrichen und die Platten mit Parafilm verschlossen. Es folgte eine Inkubation für 2-3 Tage bei 28°C. Drei bis vier einzelne Kolonien wurden auf frische Platte ausgestrichen und weitere zwei Tage bei 28°C inkubiert. Einzelne Kolonien wurden mit einer Impföse abgenommen und in 1 ml 15%-igem Glycerin (v/v) gelöst. Die Zellen wurden bis zur weiteren Verwendung zunächst in flüssigen Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt.

2.4.16.3 Transformation von Gerstenembryonen mit *Agrobacterium tumefaciens*

Am Tag vor der Gerste-Transformation wurden 200 µl der Agrobaktériensuspension (gelöst in 15%-igem Glycerin) in einem Erlenmeyerkolben mit 10 ml YEB-Medium (inklusive 25 µg ml⁻¹ Rifampicin, 25 µg ml⁻¹ Carbenicillin und 25 µg ml⁻¹ Spectinomycin)

transferiert und über Nacht bei 28°C auf einem Schüttler (120-150 U min⁻¹) im Dunkeln inkubiert.

Je 25 der präparierten Embryonen wurden auf eine Petrischale gelegt, und je 200 µl der Agrobaktériensuspension wurden auf die Embryonen getropft. Danach wurden die Embryonen umgedreht, so dass das Scutellum nach unten zeigte. Nach 40 min wurden die inokulierten Embryonen auf neue Petrischalen, welche Kallusinduktionsmedium (C-) enthielten, transferiert und 2 Tage im Dunkeln inkubiert, um das Wachstum von Kalli anzuregen. Zehn der sich entwickelten Kalli (Abb. 6) wurden auf frische Platten mit Kallusinduktionsmedium (C+), welche nun Antibiotika enthielten (50 µg ml⁻¹ Hygromycin, 150 µg ml⁻¹ Tetracyclin und 150 µg ml⁻¹ Clavulansäure), umgesetzt und zwei Wochen bei 24°C im Dunkeln inkubiert. Durch die Zugabe der Antibiotika konnte eine Selektion von transformiertem Gewebe vorgenommen werden. Putativ transgene Kalli zeigten schnelles Wachstum, wohingegen sich untransformierte Kalli braun färbten und das Wachstum einstellten (Abb. 7).



Abbildung 7: Kalli auf Kallusinduktionsmedium. Links: untransformierter Kallus; rechts: putativ transgener Kallus.

Die Umsetzung der gewachsenen Kalli auf frische (C+) Platten erfolgte in zweiwöchigem Rhythmus. Hierbei wurden die Kalli mit einem Skalpell in kleinere Stücke geschnitten, um eine möglichst große Anzahl transformierter Pflanzen zu erhalten.

2.4.16.4 Gewebekultur – Induktion von Spross- und Wurzelbildung

Nach sechs Wochen wurden bis zu 10 Kalli auf tiefe Petrischalen umgesetzt, welche Sprossinduktionsmedium enthielten. Die Schalen wurden anschließend in einen Gewebekulturschrank (A1000, Conviron, Winnipeg, Kanada) gestellt und unter folgenden Bedingungen kultiviert: 16/8 h Licht/Dunkelheit, 150 µmol m⁻² s⁻¹, 22/18°C, 65% relative Luftfeuchtigkeit). Die Petrischalen wurden in den ersten drei bis vier Wochen mit einem dünnen Papiertuch abgedunkelt. In den anschließenden zwei Wochen bildeten sich erste grüne Bereiche. Kalli mit mindestens einem Blatt von ein bis zwei Zentimetern Länge wurden dann in neue tiefe Petrischalen mit Wurzelinduktionsmedium gesetzt und weitere 3-4 Wochen im Gewebekulturschrank

unter Licht angezogen. Entwickelte Pflanzen mit einer Sprosslänge von drei bis vier Zentimetern und einer Wurzel wurden vorsichtig in kleine tiefe Gläser umgesetzt, welche 12 ml des C+-Kallusinduktionsmediums enthielten und mit Parafilm abgedeckt wurden. Transformierte Pflanzen bildeten ein starkes Wurzelsystem aus und wurden in Erde umgesetzt, sobald die Sprosse die Abdeckung der Gläser berührten. Die in Töpfe transferierten Pflanzen wurden in einer Gewächshauskabine weiterkultiviert. Die Anzucht transformierter Gerstenpflanzen bis zur Samenreife erfolgte wie in Abschnitt 2.3.4 beschrieben.

2.4.17 Expressionsanalyse der *Sperminsynthase*- und *Spermidinsynthase*-Gene in Gerste

Die Expressionsanalyse von *HvSPMS1*, *HvSPMS2* und *HvSPDS* über den kompletten Entwicklungszyklus der Gerste wurde mit der Sorte Golden Promise durchgeführt. Dafür wurden die Pflanzen wie unter Kapitel 2.3.4 für die Anzucht von Spenderpflanzen zur Herstellung transgener Gerste beschrieben angezogen und Pflanzenmaterial zu den festgelegten Zeitpunkten geerntet. Der Versuchszeitraum lag zwischen drei und 119 Tagen und umfasste mehrere Entwicklungsstadien, beginnend vom 1-3 Blatt-Stadium über Bestockung, Schossen, Ährenschieben, Blüte, bis zur Reife und dem Absterben der Pflanze.

Zur Bestimmung der Expression von *HvSPMS1*, *2* und *HvSPDS* unter Trockenstress wurden die Pflanzen zunächst wie unter 2.3.4, hier in Mitscherlich-Gefäßen, angezogen. Die Pflanzen der Sorte Tadmor als Trockenstress-tolerante Sorte, Scarlett als Trockenstress-sensitive Sorte und Golden Promise als Kontrollsorte wurden für diesen Versuch genutzt. Trockenstress wurde induziert durch Aussetzen der Bewässerung und damit einhergehendem Austrocknen des Bodens. Kontrollen ohne Trockenstress wurden weiter bewässert. Die Bestimmung des Bodenwassergehaltes erfolgte durch Wiegen der Töpfe. 100% Bodenwassergehalt wurde durch Wiegen von mit Wasser gesättigten Boden bestimmt, 0% Bodenwassergehalt durch Wiegen nach 5 Tagen Trocknung bei 80°C. Pflanzenmaterial wurde bei einem Bodenwassergehalt von 40% (T1), 20% (T2) sowie 10% (T3) geerntet.

Sowohl im Versuch zur Bestimmung der Expression in unterschiedlichen Entwicklungsstadien als auch im Trockenstressversuch wurde Blattmaterial genutzt. Beide Versuche wurden zweimal wiederholt. Es wurde aus dem Blattmaterial RNA isoliert und eine cDNA-Synthese durchgeführt wie in Abschnitten 2.4.1 und 2.4.2 beschrieben. Die Transkriptabundanz der zu untersuchenden Gene wurde mittels qRT-PCR unter Verwendung Gen-spezifischer Primerpaare ermittelt. In allen Versuchen

wurde von je drei Pflanzen Blattmaterial entnommen. Die cDNA zur Quantifizierung der Genexpression wurde zunächst 1:20 verdünnt und folgender PCR-Ansatz pipettiert:

H ₂ O	1,5 µl
POWER SYBR Green PCR Mix	12,5 µl
5 µM Vorwärts-Primer	0,5 µl
5 µM Rückwärts-Primer	0,5 µl
<u>Template (verschiedene cDNA-Verdünnungen oder Wasser (Kontrolle))</u>	<u>5,0 µl</u>
Gesamt	20,0 µl

Die PCR-Reaktionen wurden in einem Thermocycler (Eppendorf Realplex S4) mit folgenden Parametern durchgeführt:

Schritt	Prozess	Zeit	Temperatur
1	initiale Denaturierung	10 min	95°C
2-41 (40x)	Denaturierung	15 sec	95°C
	Annealing	30 sec	60°C
	Elongation	30 sec	72°C
42	Denaturierung	1 min	95°C
43 (70x)	Schmelzkurve	10 sec + 0,5°C je Zyklus	55-95°C

Die Genexpressionswerte wurden auf die Expression von *Actin2* (AY145451) oder *GAPDH* (glyceraldehyde-3 phosphate dehydrogenase, DQ196027) als interne Kontrolle normalisiert, und die Effizienz der verwendeten Primerpaare wurde anhand von Verdünnungsreihen bestimmt. Die Bestimmung der Schmelzkurven aller innerhalb der PCR entstandenen PCR-Produkte erfolgte im Anschluss. Damit konnten PCR-Artefakte von den spezifischen PCR-Produkten unterschieden werden, da PCR-Artefakte durch ihre andere Länge veränderte Schmelztemperaturen haben. Die Berechnung der relativen Transkriptgehalte erfolgte mittels der Ct-Werte für die ausgewählte cDNA-Verdünnung der jeweiligen zu untersuchenden Proben relativ zur Kontrolle.

2.5 Physiologische Methoden

2.5.1 Messung der stomatären Leitfähigkeit mittels Porometer

Um den Effekt von Spermin auf die Transpiration zu untersuchen, wurden Gerstenpflanzen wie unter 2.3.4 beschrieben für die Anzucht von Spenderpflanzen zur Herstellung transgener Gerste angezogen. Für den Versuch wurden Pflanzen 2 Wochen nach der Keimung untersucht. Die Pflanzen wurden mit 10 ml einer 1 mM Spermin-HCl/Tween20 (1 Tropfen) Lösung besprüht. Die Kontrollpflanzen wurden mit 10 ml einer Wasser/Tween20 (1 Tropfen) Lösung besprüht. Des Weiteren gab es eine Kontrollvariante, die nicht besprüht wurde. Zwei Stunden nach dem Einsprühen der Pflanzen wurde an drei Blättern jeder Pflanze die stomatäre Leitfähigkeit mit Hilfe eines AP-4 Porometers (Delta-T Devices, Cambridge, UK) gemessen. Insgesamt wurden die Messungen an drei Replikaten pro Versuchsglied und an drei aufeinanderfolgenden Tagen durchgeführt.

2.5.2 Messung der Blattflächentemperatur mittels Infrarotkamera

Mittels einer Wärmebildkamera (Flir T650sc mit 25°-Objektiv, Flir, USA) wurde die Oberflächentemperatur der Blätter von Gerstenpflanzen ermittelt. Dafür wurden die Gerstenpflanzen verwendet, die auch in Porometermessung analysiert wurden (Kapitel 2.5.1). Wärmebildaufnahmen wurden jeweils vor dem Besprühen und zwei Stunden nach dem Besprühen mit den unterschiedlichen Lösungen (2.5.1) durchgeführt. Zur Auswertung wurde das Programm Flir Tools (Version 4.1) genutzt und mittels zufällig gewählten Messpunkten die Temperaturen ermittelt.

2.5.3 Stomata-Bioassays

Die Anzucht der Pflanzen erfolgte wie in 2.3.4 beschrieben. Pro Versuch wurden von drei verschiedenen Gerstenpflanzen je drei voll entwickelte Blätter geerntet und einzelne Streifen der Blattepidermis von jedem Blatt präpariert. Dazu wurden Epidermisstreifen mittels Skalpell und Pinzette von der abaxialen Blattseite abgezogen und in einem Puffer, welcher die Öffnung der Stomata initiiert (10 mM MES-KOH (pH 6.15), 50 mM KCl, 50 μ M CaCl₂), zwei Stunden unter den gleichen Lichtbedingungen wie die der Spenderpflanzen inkubiert. Anschließend wurden verschiedene Polyamine, ABA oder H₂O₂ in den angegebenen Konzentrationen zugegeben und die Epidermisstreifen für weitere 2 Stunden inkubiert. Als Kontrollen wurden gleiche Mengen an Lösungsmitteln (Wasser oder Ethanol) zugegeben. Für die Messung der stomatären Öffnungsweite wurden die behandelten Epidermisstreifen auf Objektträger gelegt, die zuvor mit Öffnungspuffer befeuchtet wurden, und mit einem Deckglas abgedeckt. Pro

Versuchsglied wurden mindestens 30 Stomata von jedem Epidermisstreifen unter dem Mikroskop vermessen. Hierzu wurde ein Axioskop (Carl Zeiss) mit 40x Objektiv, Kamera (AxioCam HRc, Carl Zeiss) und zugehöriger Software (AxioVision online measurement tool, Carl Zeiss) eingesetzt. Die Messungen wurden an drei Epidermisstreifen durchgeführt und die Versuche dreimal an unterschiedlichen Tagen wiederholt. Diverse Inhibitoren und ein Antioxidans wurden eingesetzt, um den Wirkmechanismus von Spermin auf die Spaltöffnungsweite zu untersuchen. Guazatinacetat diente zur Inhibierung der PAO; Ascorbinsäure wurde genutzt, um reaktive Sauerstoffspezies abzufangen, welche durch die Applikation von Spermin gebildet werden. Diphenyleneiodoniumchlorid (DPI) wurde als NADPH Oxidase-Inhibitor eingesetzt. Alle Substanzen wurden nach der Präparation der Epidermisstreifen in den Puffer zur Öffnung der Stomata appliziert. Nach zwei Stunden wurde Spermin zum Medium gegeben, die Epidermisstreifen weitere zwei Stunden inkubiert und die Spaltöffnungsweite anschließend unter dem Mikroskop gemessen.

2.5.4 Färbeverfahren zum Nachweis von ROS

Zur Analyse der Spermin-induzierten ROS- und O_2^- -Produktion in Schließzellen wurden die Epidermisstreifen auf unterschiedliche Weise gefärbt. Zur Visualisierung von H_2O_2 wurde der Farbstoff 3,3'-Diaminobenzidin (DAB-HCl, Sigma, St. Louis, MO, USA) genutzt. Epidermisstreifen wurden wie unter 2.5.3 beschrieben präpariert. Spermin wurde in verschiedenen Konzentrationen zugegeben und für 2 Stunden inkubiert, und die behandelten Streifen wurden in eine 1 mg ml^{-1} DAB-HCl-Lösung transferiert. Die Infiltration erfolgte für 30 oder 60 Minuten unter Vakuum bei Raumtemperatur. Danach wurde zunächst die DAB-Färbelösung mit Ethanol ausgewaschen und anschließend mit kochendem Ethanol (99 %) das Chlorophyll entfernt. Zum Nachweis von O_2^- wurde Nitroblau-Tetrazolium (NBT) in der Konzentration 1 mg ml^{-1} verwendet. Die Färbezeit betrug in diesem Fall eine Stunde. Die Bildung von O_2^- zeigte sich durch Blaufärbung, die von H_2O_2 als rötlich-braune Färbung. In beiden Fällen wurden die Epidermisstreifen auf einen Objektträger gelegt und Bilder am Mikroskop (Axioskop, Carl Zeiss) aufgenommen. Eine weitere Färbung zur Visualisierung von H_2O_2 erfolgte mit dem sensitiveren Farbstoff 2',7'-Dichlorfluorescein Diacetat ($H_2DCF\text{-DA}$). Die Epidermisstreifen wurden ebenfalls wie in 2.5.3 beschrieben für zwei Stunden in Öffnungspuffer inkubiert. Anschließend wurden $50 \text{ }\mu\text{M}$ $H_2DCF\text{-DA}$ zum Medium hinzugegeben und die Epidermisstreifen weitere 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde der überschüssige Farbstoff mit deion. Wasser ausgewaschen, und die Fluoreszenz wurde am Mikroskop (Axio-Observer Z.1, Carl Zeiss, Filterset 38 HE Anregung 450-490nm, Emission 500-550nm, Anregung mit 488nm Laser) mit

angeschlossener Kamera (AxioCam MRm, Carl Zeiss) aufgenommen und mittels AxioVision-Software quantifiziert.

2.5.5 Analyse der zytosolischen Calciumkonzentration an kompletten Pflanzen mittels Luminometer

Zur Bestimmung der freien zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration an kompletten Pflanzen wurden Gersten- bzw. *A. thaliana*-Pflanzen genutzt, welche das *APOAEQUORIN*-Gen unter Kontrolle des ZmUBI- bzw. des CaMV-35S-Promoters exprimieren. Die Bindung von Ca^{2+} an Aequorin führt zur Oxidation der prosthetischen Gruppe, Coelenterazin, wodurch Lumineszenz entsteht. Diese kann mit Hilfe von Lumineszenzdetektoren gemessen werden kann.

Die Anzucht der Pflanzen erfolgte wie unter 2.3.4 beschrieben, jedoch unter Kurztag-Bedingungen mit einem Tag/Nacht Rhythmus von 14h/10h. Die transgenen Gerstenpflanzen, welche das *APOAEQUORIN*-Gen konstitutiv exprimierten, wurden drei Tage in Flüssigmedium (Anhang Tab. 8) angezogen. Zur Rekonstituierung von Apoaequorin zu Aequorin wurden die zu untersuchenden Pflanzen über Nacht in 10 μM Coelenterazin-Lösung (Stammlösung: 1 mM in Methanol) inkubiert. Am Tag der Untersuchung wurden 500 μl Wasser in Luminometerröhrchen (Sarstedt) gegeben und je eine Pflanze pro Röhrchen überführt. Die Pflanzen wurden ungefähr zwei Stunden im Dunkeln inkubiert, um Auswirkungen durch das Umsetzen zu vermeiden. Die Aequorinlumineszenz wurde mit einem Sirius-2 Luminometer (Titertek-Berthold, Pforzheim, Deutschland) detektiert. Nach Beginn der Messung wurde zunächst abgewartet, bis sich die Lumineszenz auf Ebene der Grundlinie stabilisiert hatte. Anschließend erfolgte die Injektion des jeweiligen Stimulus. Die Lumineszenzwerte wurden in einem Messintervall von 0,2 sek aufgezeichnet. Die Entladung des verbliebenen Aequorins erfolgte durch eine Zugabe einer Lösung aus 2 M CaCl_2 und 20% Ethanol. Das Volumen der Entladelösung entsprach dem Volumen der sich bereits im Luminometerröhrchen befindlichen Lösung. Die Berechnung der $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ erfolgte wie in Rentel und Knight (2004) beschrieben.

2.5.6 Makroskopische bildliche Darstellung der zytosolischen Calciumkonzentration mittels Photonenzählkamera

Die Messung der $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ in einzelnen Pflanzenteilen erfolgte ebenfalls mittels Aequorin-Lumineszenz. Die Keimlinge wurden in flüssigem $1/2$ -fach konzentriertem MS-Medium angezogen, welches zusätzlich 2,5 g L^{-1} Saccharose enthielt. Die Anzucht der Keimlinge erfolgte in 24-Loch-Platten unter den in 2.3.3 beschriebenen Bedingungen zur Anzucht von Arabidopsispflanzen. Die Rekonstituierung der Pflanzen erfolgte über Nacht. Dafür

wurden 100 μl einer 10 μM Coelenterazinlösung pro Loch gegeben und die Pflanzen darin im Dunkeln 16 h inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Lösung abgenommen und durch 100 μl Wasser ersetzt, die Pflanzen in Spross und Wurzel separiert und die einzelnen Pflanzenteile weitere zwei Stunden im Dunkeln inkubiert. Zur Messung wurden die Pflanzenteile separat auf mit Wasser gefüllte Petrischalen gelegt. Die Lumineszenz wurde mit einer hochauflösenden photonenzählenden Kamera (HRPCS218; Photek, St Leonards on Sea, UK) aufgenommen, die über eine bildverstärkende CCD-Kamera (ICCD218; Photek) und einen Controller (HRPCS4; Photek) verfügte. Die Kamera befand sich in einer Dunkelkammer (DB-2, Photek). Die Signalerfassung und -verarbeitung erfolgte mit der Software IFS32 (Photek). Die Photonen wurden in einem Intervall von 200 ms erfasst. Nach jeder Behandlung der zu untersuchenden Pflanzenteile wurde das verbliebene Aequorin entladen. Hierfür wurden die Pflanzenteile mit einer Entladelösung, welche aus 1 M Calciumchlorid (CaCl_2) und 10% Ethanol bestand, geflutet und die Aequorinlumineszenz dabei erfasst. Die Auswertung erfolgte nach Ende des jeweiligen Experimentes.

2.5.7 Messung der zytosolischen Calciumkonzentration an einzelnen Schließzellen

A. thaliana Col-0 Pflanzen, welche stabil das Gen des Ca^{2+} -Indikatorproteins YC 3.6 exprimierten, wurden freundlicherweise von Karin Schumacher (Universität Heidelberg) bereitgestellt. Für die Ca^{2+} -Messungen an einzelnen Schließzellen wurden die Pflanzen vier bis sechs Wochen in einem Erde-Vermiculit-Gemisch (2:1) kultiviert. Die Kultivierung erfolgte in einem Anzuchtschrank (ATC26; Conviron, Winnipeg, MB, Canada) unter Kurztagbedingungen (Tag/Nachtrhythmus 10 h/14 h, 150 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$) bei einer mittleren relativen Luftfeuchte von 65%. Die Präparation der Epidermisstreifen erfolgte in Anlehnung an die Beschreibung von Allen et al. (1999). Grüne, voll entwickelte Blätter wurden mittels medizinischem Sprühkleber (Hollister, Libertyville, IL, USA) auf Deckgläschen geklebt. Die untere Epidermis zeigte dabei zum Glas. Nach einer kurzen Trocknungszeit anschließend mit einer scharfen Rasierklinge das obere Pflanzengewebe abgeschabt, so dass nur noch die untere Epidermis auf dem Deckgläschen verblieb. Die so vorbereiteten Epidermisstreifen wurden zwei Stunden in Inkubationspuffer [10 mM MES-KOH (pH 6,15, filtersterilisiert), 50 mM KCl (autoklaviert), 50 $\mu\text{M CaCl}_2$ (autoklaviert)] unter denselben Bedingungen wie die Pflanzen inkubiert (Abb. 8).



Abbildung 8: Methodischer Ablauf zur Calciummessung an Schließzellen. A. Präparation der Epidermisstreifen mittels Rasierklinge. B. Fixierung in der Messkammer. C. Messung von Ca²⁺-Signalen.

Das Deckgläschen mit der präparierten Epidermis wurde in eine Perfusionskammer gespannt (RC-26G; Warner Instruments, Hamden, CT, USA) und diese mit 360 µl Inkubationspuffer befüllt. Zur Analyse des [Ca²⁺]_{cyt}-abhängigen Verhältnisses der Fluoreszenzintensität von CFP (cyan fluoreszierendes Protein) und YFP (gelb fluoreszierendes Protein) wurde ein inverses Fluoreszenzmikroskop (AxioObserver, Carl Zeiss) genutzt. Als Anregungslichtquelle diente eine LED mit 445 nm und einem 434/14 nm Filter. Die Fluoreszenz von CFP und YFP wurde durch einen 78 HE ms Filtersatz (Carl Zeiss) getrennt, in welchem der Langpassfilter LP 530 nm durch einen Bandpassfilter BP 542/27 nm ausgetauscht war, um Chlorophyll-Autofluoreszenz zu minimieren. Die Aufnahme der Bilder erfolgte durch zwei digitale Kameras (AxioCamMRm V.3, Carl Zeiss), welche mit einem Adapter verbunden waren, der eine Mehrfachaufnahme mit unterschiedlichen Emissionsfiltern ermöglichte. Die Analyse wurde mit Hilfe des Physiologie-Moduls der AxioVision Software (Version 4.8.2, Carl Zeiss) durchgeführt (Abb. 8). So konnte von den vorher im Programm festgelegten und markierten einzelnen Schließzellen die Intensität der Fluoreszenz der CFP- und YFP-Kanäle simultan aufgenommen werden. Die Verhältnismerte wurden durch Division der Intensität von YFP zu CFP bestimmt. In Standardexperimenten wurden die Zellen zunächst 10 Minuten in einem Intervall von 20 s beobachtet und anschließend 5 Minuten in einem Intervall von 5 s. Nach diesen 15 Minuten wurden die zu untersuchenden Substanzen, wie Spermin oder ABA, vorsichtig hinzu pipettiert. Zellen, welche keine Reaktion auf einen Stimulus zeigten, wurden von der späteren Analyse ausgeschlossen.

2.6 Statistische Auswertung

Um statistisch signifikante Unterschiede zwischen Mittelwerten zweier unabhängiger Stichproben nachzuweisen, wurde zunächst sichergestellt, dass die Daten der Stichproben einer normalverteilten Grundgesamtheit entstammen (Shapiro Wilk Test)

bzw. es genügend große Stichprobenumfänge gab. Signifikante Unterschiede zwischen zwei Mittelwerten wurden angenommen, wenn der Signifikanzwert p 0,05 (signifikant), bzw. 0,01 (hochsignifikant) unterschritt (t -Test). Für die Ermittlung von Unterschieden zwischen mehreren Mittelwerten wurde nach Anwendung einer Varianzanalyse der Tukey-Kramer Test ($p < 0,05$) durchgeführt. Für die Auswertungen wurde das Softwarepaket SigmaPlot genutzt.

3 Ergebnisse

3.1 Rolle von Spermin bei abiotischem Stress

3.1.1 Einfluss von Sperminapplikation auf die Salz- und Trockenstresstoleranz von Gerstenpflanzen

In hydroponischen Kulturen wurde die Toleranz von Gerstepflanzen gegenüber Salzstress (NaCl) und osmotischem Stress (PEG 6000) getestet. Parallel dazu wurde in den hydroponischen Kulturen der Effekt von extern appliziertem Spermin während des Trocken- beziehungsweise Salzstress untersucht. Die Pflanzen aller Varianten entwickelten sich bis zum Dreiblattstadium. Der Zuwachs der Sprosslänge zwischen 7. und 21. Tag nach der Keimung wies keinen Unterschied zwischen den Kontrollpflanzen und den Pflanzen, die mit verschiedenen PEG-Konzentrationen behandelt wurden, auf (Abb. 9a). Zusätzlich wurde untersucht, ob der Zusatz von Spermin zu den mit PEG behandelten Pflanzen einen Einfluss auf die Pflanzen hatte. Nur in der Kombination von 8% PEG und Spermin konnte ein signifikanter Einfluss in Form von vermindertem Sprosszuwachs beobachtet werden. Die weiteren Kombinationsbehandlungen von Spermin und PEG hatten keinen Einfluss auf das Sprosslängenwachstum. Der Zuwachs der Wurzeln wurde dagegen signifikant durch die Behandlung mit PEG-Konzentrationen in Höhe von 14,6% und 16% beeinflusst (Abb. 9a). Die Kontrollpflanzen zeigten einen durchschnittlichen Zuwachs der Wurzelsystemlänge von 43 cm. Der Wurzelzuwachs sank um rund 50% bei Zugabe von 14,8% oder 16% PEG. Der Zusatz von 1 mM Spermin zur hydroponischen Kultur beeinflusste den Wurzelzuwachs lediglich in der Kombination 8% PEG und Spermin signifikant. In den Kombinationsbehandlungen 14,6% PEG bzw. 16% PEG und Spermin konnte kein signifikanter Effekt auf das Wurzelwachstum durch die zusätzliche Gabe von Spermin beobachtet werden.

Ein Einfluss von Spermin konnte aber auf die Trockenmasse der Pflanzen nach Beendigung des Versuches beobachtet werden (Abb. 9b). Die PEG-Behandlung führte in allen drei Konzentrationen zu einer Verringerung der Trockenmasse von Spross und Wurzel. Wurden die Pflanzen mit PEG behandelt, sank die Trockenmasse der Wurzeln um durchschnittlich 43% in allen drei PEG-Varianten. Die zusätzliche Applikation von Spermin führte zu einer nochmaligen Reduktion der Trockenmasse um 64% (8% und 14,8% PEG). Auch in den Trockenmassen des Sprosses zeigte sich dieser Verlauf (Abb. 9b). Die Behandlungen mit PEG verringerten die Trockenmasse um durchschnittlich 60%. Die Zugabe von Spermin führte hier ebenfalls zu einer nochmaligen Verringerung der Trockenmasse um durchschnittlich 85%.

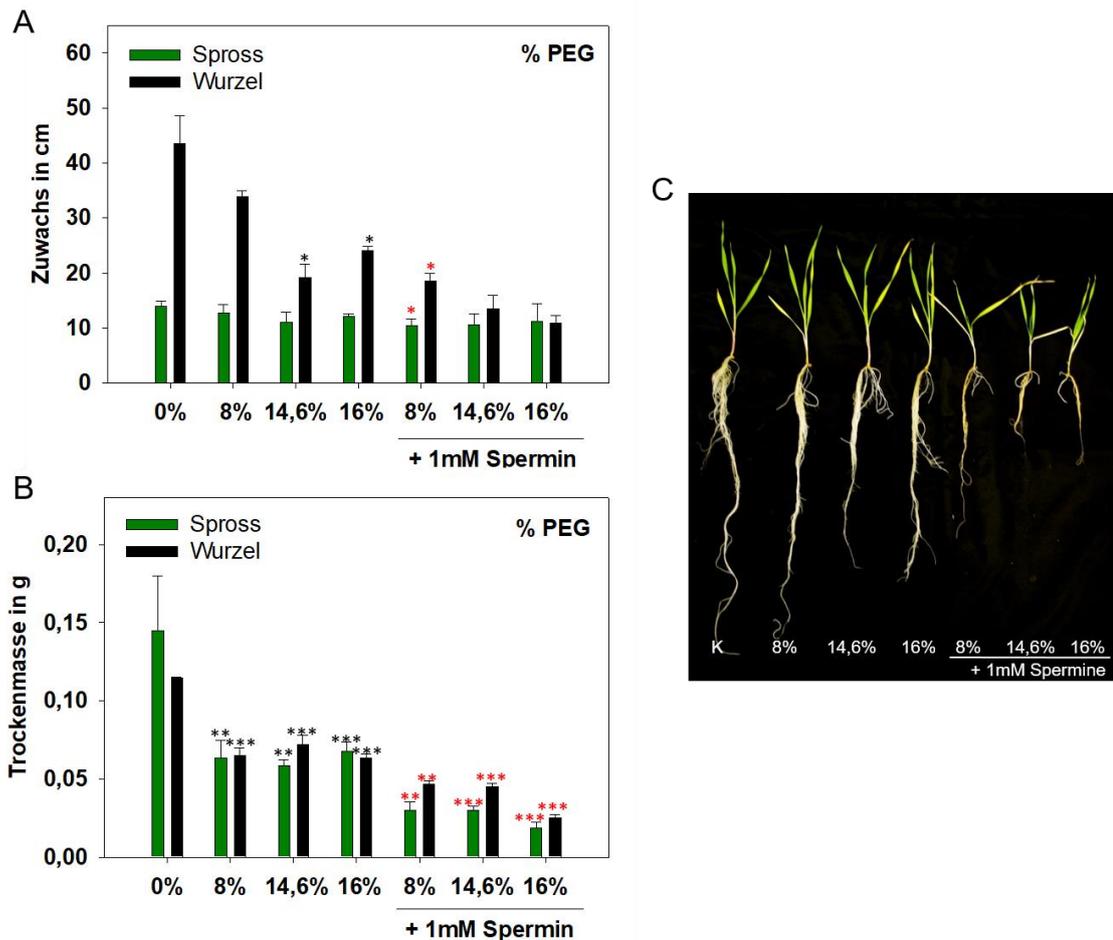


Abbildung 9: Wachstum einer hydroponischen Gerstenkultur unter Zusatz von PEG 6000 (8 %, 14,8 %, 16 %) und 1 mM Spermin zum Medium. Zuwachs zwischen 7-21 Tagen nach der Keimung A) von Spross- und Wurzellänge und B) Spross- und Wurzelrockenmasse. C) Phänotyp der behandelten Pflanzen im Vergleich zur Kontrolle 21 Tage nach der Keimung. Balken repräsentieren Mittelwerte (\pm SF) von drei Pflanzen pro Behandlung. Signifikante Unterschiede sind gekennzeichnet mit * = $P < 0,05$, ** = $P < 0,01$, *** = $P < 0,001$. Schwarze Sternchen zeigen signifikante Unterschiede zwischen PEG-behandelten Pflanzen und Kontrollpflanzen. Rote Sternchen zeigen signifikante Unterschiede zwischen den Spermin-behandelten und -unbehandelten Pflanzen der jeweiligen PEG-Konzentrationen.

Die Abbildung 9c zeigt Gerstepflanzen nach Beendigung des Versuches. Die Pflanzen zeigten eine deutlich gelbe bis braune Verfärbung der Wurzeln bereits fünf Tage nach der Applikation von 1 mM Spermin (Abb. 9c), während die Wurzeln der Kontrollpflanzen und der mit PEG behandelten Pflanzen eine typisch weiße Färbung zeigten. Die Zugabe von Spermin ließ zudem einen schleimigen Film um die Wurzeln entstehen.

In einem weiteren Experiment wurden Gerstenpflanzen durch die Zugabe von 50, 100 und 150 mM NaCl einem Salzstress ausgesetzt. Zusätzlich wurde wiederum 1 mM Spermin zugesetzt. Untersucht wurde, ob es einen signifikanten Unterschied zwischen den einzelnen NaCl-Konzentrationen mit und ohne Sperminzugabe gibt. Der Zuwachs des Sprosses der Kontrollpflanzen lag im Durchschnitt bei 12 cm (Abb. 10a). Die Zugabe von NaCl in den unterschiedlichen Konzentrationen führte zu keiner signifikanten Veränderung des Sprosszuwachses im Vergleich zur Kontrolle. Die zusätzliche Gabe von Spermin führt zu keiner Veränderung des Sprosszuwachses im Vergleich zu den mit NaCl-behandelten Pflanzen. Bei den Wurzeln konnte ein um rund 40% verringerter Zuwachs bei der Behandlung der Gerstenpflanzen mit 150 mM NaCl beobachtet werden. Die Konzentrationen 50 mM und 100 mM hatten keinen signifikanten Einfluss auf das Wurzelwachstum. Die Zugabe von Spermin wirkte sich signifikant negativ auf den Wurzelzuwachs von Pflanzen aus, welche mit 100 mM NaCl behandelt wurden. Einen weiteren Einfluss auf die mit 50 mM und 150 mM NaCl-behandelten Pflanzen konnte für die Kombinationsbehandlung mit Spermin nicht nachgewiesen werden. Der Salzstress führte zu keiner signifikanten Veränderung der Sprosstrockenmasse. Die Kombination aus Salzstress und Spermin führte im Vergleich zu den mit NaCl-behandelten Pflanzen ebenfalls zu keiner signifikanten Veränderung in der Trockenmasse des Sprosses. Die Trockenmasse der Wurzeln wurde lediglich durch 150 mM NaCl signifikant um 34% reduziert (Abb. 10b). Eine Kombination aus NaCl und Spermin ergab keine signifikanten Veränderungen im Vergleich zu den NaCl-behandelten Pflanzen. Auch in diesem Versuch wiesen die Versuchspflanzen nach dem Zusatz von Spermin zum Medium eine gelbliche Verfärbung der Wurzeln auf (Abb. 10c).

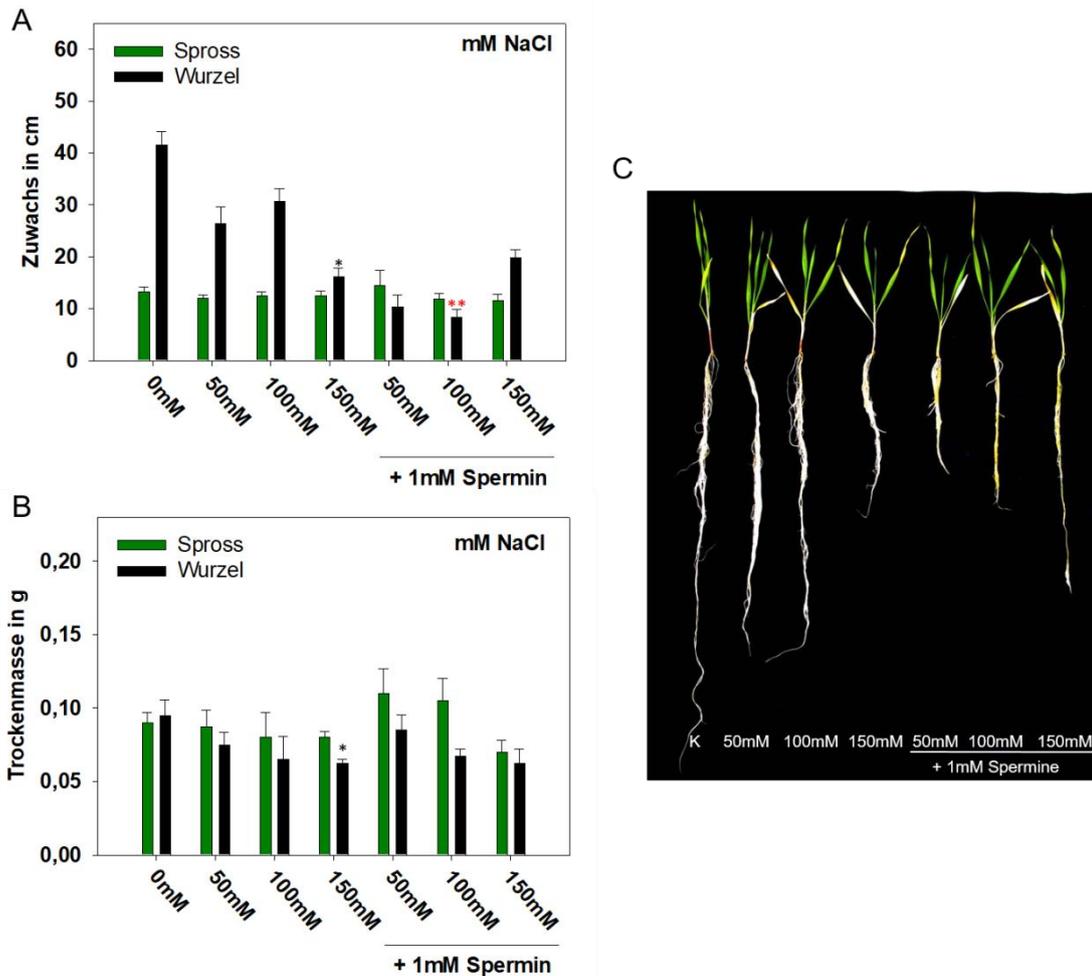


Abbildung 10: Wachstum einer hydroponischen Gerstenkultur unter Zusatz von NaCl (50, 100, 150 mM) und 1 mM Spermin zum Medium. Zuwachs zwischen 7-21 Tagen nach der Keimung A) von Spross- und Wurzellänge und B) Spross- und Wurzelrockenmasse. C) Phänotyp der behandelten Pflanzen im Vergleich zur Kontrolle 21 Tage nach der Keimung. Balken repräsentieren Mittelwerte (\pm SF) von vier Pflanzen pro Behandlung. Signifikante Unterschiede sind gekennzeichnet mit * = $P < 0.05$, ** = $P < 0.01$, *** = $P < 0.001$. Schwarze Sternchen zeigen signifikante Unterschiede zwischen NaCl-behandelten Pflanzen und Kontrollpflanzen. Rote Sternchen zeigen signifikante Unterschiede zwischen den Spermin-behandelten und -unbehandelten Pflanzen der jeweiligen NaCl-Konzentrationen.

Da sich in diesen Versuchen eine negative Auswirkung von Spermin auf das Wurzelsystem zeigte, wurde in weiterführenden Experimenten die Wirkung von Spermin bei Applikation zum Spross betrachtet.

3.1.2 Einfluss von Sperminapplikation auf die Blattflächentemperatur und die stomatäre Leitfähigkeit von Gerstenpflanzen

Um einen möglichen Einfluss von Spermin auf die Transpiration und damit auch auf die Trockenstresstoleranz zu analysieren, wurden sieben Tage alte Gerstenpflanzen mit einer 1 mM Sperminlösung besprüht und die Transpiration im Vergleich zu unbehandelten Kontrollpflanzen und mit Wasser besprühten Pflanzen untersucht. Die stomatäre Leitfähigkeit wurde sowohl vor dem Versuch als auch zwei Stunden nach Besprühen der Pflanzen mittels Porometer gemessen, Versuchsbeginn war jeweils 10 Uhr. Untersucht wurden jeweils fünf Primärblätter (Abb. 11). Zu Beginn des Versuchs lagen die Leitfähigkeitswerte in den Primärblättern in allen drei Versuchsvarianten auf vergleichbarem Niveau. Im Mittel bewegten sich diese Werte zwischen 117 und 124 $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Nach der Behandlung zeigten sich signifikant veränderte Werte nur in den mit Spermin besprühten Gerstenpflanzen. Die stomatäre Leitfähigkeit sank hier in den Primärblättern um 39% und war damit signifikant geringer als bei Gerstenpflanzen, die unbehandelt blieben oder ausschließlich mit Wasser besprüht wurden.

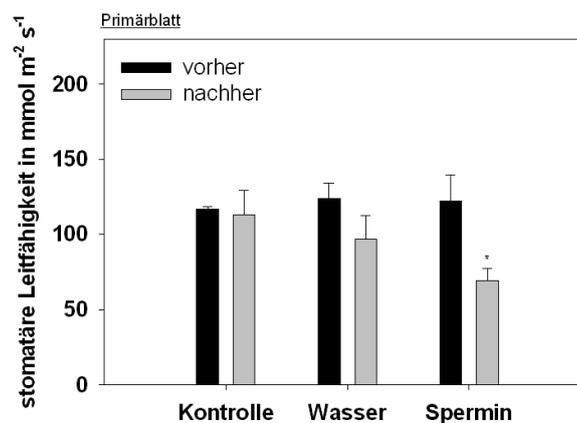


Abbildung 11: Messung der stomatären Leitfähigkeit von Gerstenprimärblättern mittels Porometer. Die Pflanzen wurden nicht behandelt (Kontrolle), mit Wasser + Tween20 besprüht (Wasser) oder mit 1 mM Spermin-HCl-Lösung + Tween20 besprüht (Spermin). Die Versuche wurden an sieben Tage alten Gerstenpflanzen vorgenommen und an drei aufeinander folgenden Tagen mit vergleichbarem Ergebnis wiederholt. Die stomatäre Leitfähigkeit wurde jeweils vor Beginn des Versuches (schwarze Balken) und zwei Stunden nach der jeweiligen Behandlung (graue Balken) gemessen. Balken repräsentieren Durchschnittswerte (\pm SF) von fünf Pflanzen pro Behandlung und drei Meßtagen. Verglichen wurden jeweils die einzelnen Behandlungen mit der Kontrolle; signifikante Unterschiede sind gekennzeichnet mit * = $P < 0.05$, ** = $P < 0.01$, *** = $P < 0.001$.

Die Blatttemperatur ist mit der Transpiration negativ korreliert und stellt damit eine weitere einfach zu erfassende Größe zur Messung der Wasserhaushalts von Pflanzen dar (Abb. 12b). Nach dem Besprühen mit Wasser oder mit Sperminlösung war die Oberflächentemperatur der Primärblätter rund 0,5°C höher als die der Kontrollpflanzen. (Abb. 12a). Interessanterweise machte es keinen Unterschied, ob die Pflanzen mit Spermin oder lediglich mit Wasser behandelt wurden. Die anhand der Porometermessungen ermittelten Unterschiede der Behandlungen zur Kontrolle in der stomatären Leitfähigkeit konnten durch Thermographie nicht nachgewiesen werden.

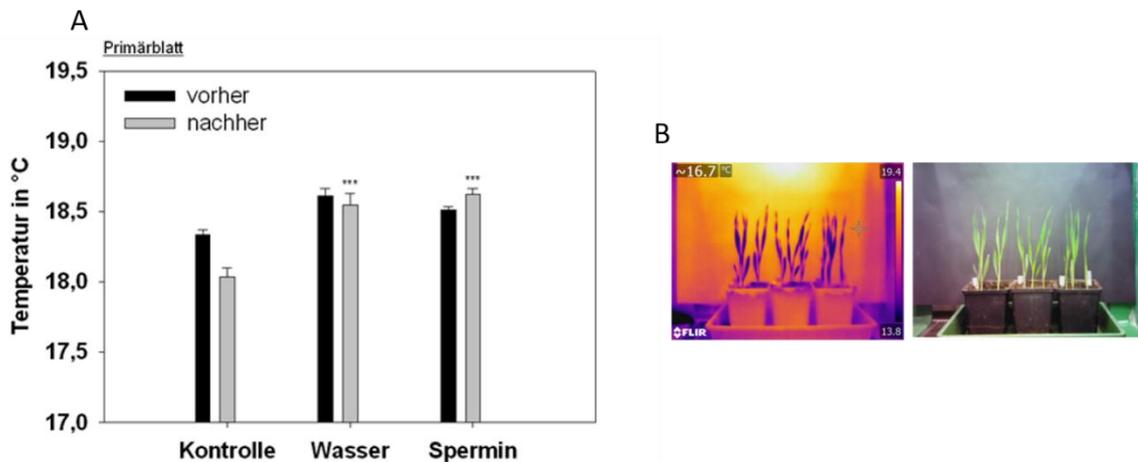


Abbildung 12: Fotografische Aufnahme von Gerstenpflanzen mittels Infrarotkamera zur Messung der Oberflächentemperatur der Primärblätter.

Die Temperatur der Primärblätter der unbehandelten Kontrolle, der mit Wasser besprühten und der mit einer 1 mM Spermin-Lösung besprühten Pflanzen wurde vor Beginn des Versuchs und nach 2 h mittels Infrarotaufnahmen ermittelt. Signifikante Unterschiede der Behandlungen zur Kontrolle sind gekennzeichnet mit * = $P < 0.05$, ** = $P < 0.01$, *** = $P < 0.001$. B) Beispielhaftes Falschfarbenbild zur Ermittlung der Oberflächentemperatur der Pflanzen (links) und entsprechende fotografische Aufnahme (rechts).

3.1.3 Einfluss von Polyaminapplikation auf die Spaltöffnungsweite von Gerstenblättern

Aufgrund des beobachteten Einflusses von Spermin auf die Transpiration sollte in den nachfolgenden Versuchen die direkte Wirkung von Polyaminen auf die Stomata untersucht werden. In einem initialen Versuch wurden Epidermisstreifen von Gerstenblättern der Sorte Golden Promise isoliert, unter Licht für zwei Stunden in Puffer, welcher die Öffnung der Stomata fördert, inkubiert und anschließend mit verschiedenen Polyaminen behandelt. Nach der Behandlung mit Putrescin, Spermidin oder Spermin konnte eine signifikante Reduktion der Spaltöffnungsweite beobachtet werden. Den

stärksten Effekt erzielten Spermidin und Spermin mit einer Reduktion um 62 und 68% im Vergleich zur wasserbehandelten Kontrolle (Abb. 13a).

Der Einsatz unterschiedlicher Sperminkonzentrationen zeigte, dass bereits 10 μM ausreichend für das vollständige Schließen der Stomata waren. In der Kontrollvariante waren die Spaltöffnungen 6,2 μm geöffnet; bereits 5 μM Spermin reduzierte die Öffnung um 47%. Eine weitere Erhöhung der Sperminkonzentration führte zu einer weiteren Reduzierung der Spaltöffnungsweite um 63 und 67% auf Werte zwischen 2,0 und 2,3 μm (Abb. 13b).

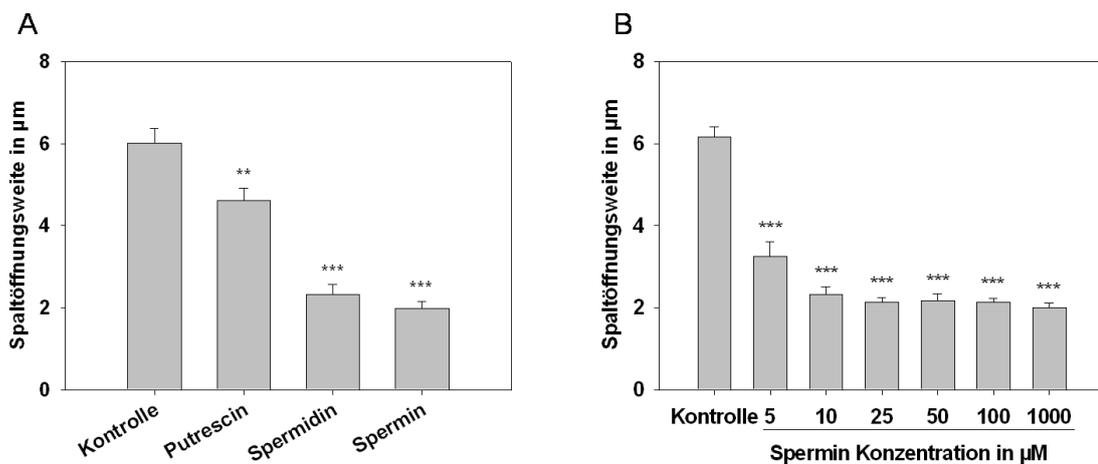


Abbildung 13: Einfluss von Polyaminen auf die Spaltöffnungsweite von Gerstenblättern. Epidermisstreifen wurden von vier bis sechs Wochen alten Blättern der Gerstensorte Golden Promise isoliert, und die Weite der Spaltöffnungen wurde nach vierstündiger Inkubation in Öffnungspuffer, davon zwei Stunden in der jeweiligen Versuchslösung unter dem Mikroskop gemessen. A) Behandlung der Epidermisstreifen mit unterschiedlichen Polyaminen (10 μM Putrescin, Spermidin, Spermin). B) Behandlung mit unterschiedlichen Sperminkonzentrationen. Daten sind Mittelwerte und Standardfehler aus drei unabhängigen Experimenten mit jeweils $n > 30$. Signifikante Unterschiede sind gekennzeichnet mit * = $P < 0,05$, ** = $P < 0,01$, *** = $P < 0,001$.

Die ermittelten Werte zeigten einen deutlichen Einfluss von Polyaminen, insbesondere Spermin, auf die Weite der Spaltöffnungen. In einem anschließenden Versuch wurde untersucht, ob sich Sorten, welche als unterschiedlich trockenstresssensitiv beschrieben sind, in dieser Reaktion unterscheiden. Dazu wurden von den Sorten Scarlett (trockenstresssensitiv) und Tadmor (trockenstresstolerant) Epidermisstreifen isoliert und diese, wie zuvor für Golden Promise beschrieben, mit 10 μM Spermin inkubiert. Nach zweistündiger Inkubation mit Spermin zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Sorten hinsichtlich der Spermin-induzierten Schließung der Stomata (Abb. 14). Beide Kontrollen wiesen ähnliche Öffnungsweiten wie zuvor bei

Golden Promise gemessen auf; die Werte lagen zwischen 6,0 μm bei Scarlett und 6,1 μm bei Tadmor. Spermin verringerte die Weite der Spaltöffnungen um 50% bei Scarlett und um 57% bei Tadmor.

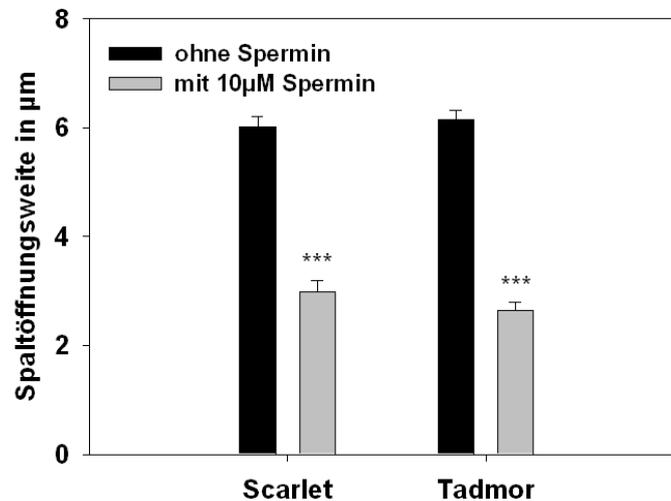


Abbildung 14: Einfluss von Spermin auf die Spaltöffnungsweite unterschiedlicher Gerstensorten. Die Spaltöffnungsweite wurde anhand isolierter Epidermisstreifen von Gerstenpflanzen der Sorten Scarlett und Tadmor nach vierstündiger Inkubation in Öffnungspuffer, davon zwei Stunden in Öffnungspuffer mit 10 μM Spermin, unter dem Mikroskop gemessen. Als Kontrollen dienten Epidermisstreifen, welchen die gleiche Menge Wasser zugegeben wurde. Gezeigte Daten sind Mittelwerte und Standardfehler aus drei unabhängigen Experimenten mit jeweils $n > 30$. Signifikante Unterschiede sind gekennzeichnet mit * = $P < 0.05$, ** = $P < 0.01$, *** = $P < 0.001$.

Es ist bekannt, dass das Schließen von Stomata unter Trockenstress durch das Phytohormon ABA induziert wird. Da auch Spermin ein Schließen bewirkte, sollte eine mögliche Interaktion beider Stoffe untersucht werden. Abbildung 15 zeigt die Ergebnisse einer Behandlung von Gersteepidermisstreifen mit je 10 μM ABA, Spermin oder einer Kombination beider Substanzen. Es kam zu einem Schließen der Stomata, wenn diese mit 10 μM ABA inkubiert werden. Eine Spermininkubation allein führte zu einem tendentiell, aber nicht signifikant stärkeren Schließen. Es konnte keine additive oder synergistische Wirkung einer Kombination der beiden Substanzen beobachtet werden; die Öffnungsweite entsprach der von Spermin-behandelten Zellen. Die Kontrollen zeigten in allen drei Versuchsvarianten ähnliche Spaltöffnungsweiten.

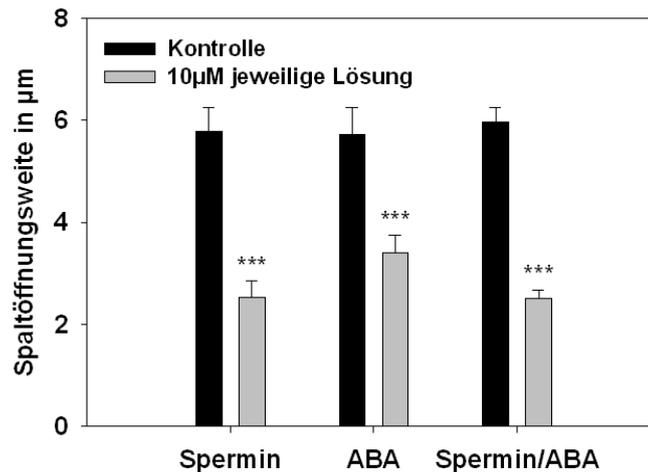


Abbildung 15: Einfluss von ABA und Spermin auf die Öffnungsweite der Stomata von Gerstenpflanzen. Die Spaltöffnungsweite wurde an Epidermisstreifen von vier bis sechs Wochen alten Blättern der Gerstensorte Golden Promise gemessen. Dargestellt ist die Weite der Spaltöffnung nach vierstündiger Inkubation in Öffnungspuffer, davon zwei Stunden in Öffnungspuffer mit 10 µM Spermin, 10 µM ABA sowie Spermin und ABA in Kombination. Als Kontrolle dienten Epidermisstreifen, denen die entsprechende Menge Wasser (Kontrolle für Spermin) beziehungsweise Ethanol (Kontrolle für ABA) appliziert wurde. Daten sind Mittelwerte und Standardfehler aus drei unabhängigen Experimenten mit jeweils $n > 30$. Signifikante Unterschiede sind gekennzeichnet mit * = $P < 0.05$, ** = $P < 0.01$, *** = $P < 0.001$.

Es stellte sich die Frage, ob der Spermin-induzierte Stomataschluss transient oder dauerhaft ist. Die Reversibilität des Stomataschlusses wurde daher über einen Zeitraum von insgesamt fünf Stunden untersucht. Hierfür wurden wiederum Epidermisstreifen nach zweistündiger Inkubation in Öffnungspuffer mit 10 µM Spermin behandelt, und nach einer weiteren zweistündigen Inkubationszeit wurde die Weite der Stomataöffnung gemessen. Danach erfolgten weitere Messungen nach 60, 120, 180, 240 und 300 Minuten (Abb. 16). Zu Beginn (Zeitpunkt $t = 0$ min) wurden Öffnungsweiten von 6,3 µm für die Epidermisstreifen der Kontrolle und 5,8 µm für die mit Spermin behandelten Epidermisstreifen ermittelt. Nach einer Stunde waren die Stomata der behandelten Epidermisstreifen noch 3,6 µm geöffnet. Es zeigte sich, dass eine maximale Schließung der Stomata durch Spermin nach einem Zeitraum von 120 Minuten erreicht wurde (2,6 µm). Anschließend öffneten sich die Spaltöffnungen wieder von 4,3 µm (180 min) über 4,8 µm (240 min) zu 6,2 µm (300 min). Die mit Wasser behandelte Kontrolle zeigte keine Verringerung der Spaltöffnungsweite, sondern insbesondere in den ersten zwei Stunden eine geringe Tendenz zu stärkerer Öffnung, so dass zu Ende des Versuchs die Stomata 8,5 µm geöffnet waren.

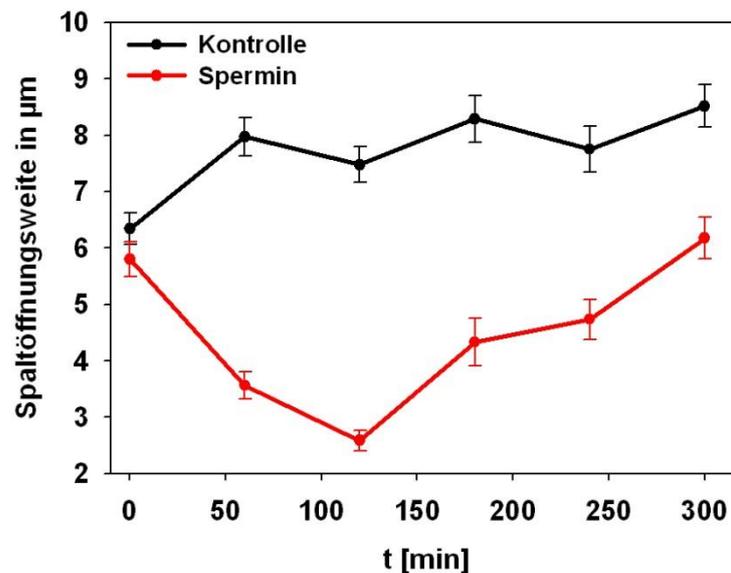


Abbildung 16: Zeitlicher Verlauf der durch Spermin induzierten Schließung der Stomata von Gerstenpflanzen. Epidermisstreifen wurden von vier bis sechs Wochen alten Gerstenpflanzen (cv. Golden Promise) isoliert und die Spaltöffnungsweite nach vierstündiger Inkubation in Öffnungspuffer (davon zwei Stunden in Öffnungspuffer mit 10 µM Spermin) über einen Zeitraum von fünf Stunden unter dem Mikroskop gemessen. Als Kontrollen dienen Epidermisstreifen, welchen die gleiche Menge Wasser zugegeben wurde. Daten sind Mittelwerte und Standardfehler aus drei unabhängigen Experimenten mit jeweils $n > 30$.

Die bisher beschriebenen Versuche wurden mit freiem Spermin durchgeführt, welches als 10 µM Lösung in Wasser einen pH-Wert von 9,3 besitzt. Im Öffnungspuffer lag der pH-Wert der Sperminlösung bei 6,21 und damit etwas höher als der des Inkubationspuffers selbst. Um einen möglichen Beitrag des pH-Wert zum Spermin-induzierten Stomataschluss zu testen, wurde die Spaltöffnungsweite nach Behandlung der Epidermisstreifen mit Inkubationspuffer von unterschiedlichen pH-Werten gemessen. Es zeigte sich, dass alleine durch den pH-Wert des Inkubationspuffers Veränderungen in der Stomataweite auftraten (Abb. 17a). In einer Pufferlösung mit pH-Wert 6,15 betrug die Spaltöffnungsweite 5,6 µm. Eine Erhöhung des pH-Werts auf 7,0 führte zu einer Reduzierung der Öffnung auf 4,1 µm; bei pH 9 waren die Stomata nur noch 2,8 µm geöffnet. Abbildung 17c zeigt exemplarische Stomata der unterschiedlichen Behandlungen. Deutlich erkennbar ist die Verminderung der Öffnungsweite in den mit pH 7 und pH 9 behandelten Spaltöffnungen gegenüber der Kontrolle, die mit pH 6,15 behandelt wurde.

Aufgrund des Effektes hoher pH-Werte wurde die Reaktion der Schließzellen auf 10 µM Spermin-HCl mit pH 6,15 in Pufferlösung untersucht. Dieser pH-Wert ist dem in der

Zellwand herrschenden ähnlich. Interessanterweise führten sowohl Spermin als auch Spermin-HCl in gleicher Weise zu einer verminderten Spaltöffnung, mit einer tendenziell stärkeren Wirkung von Spermin-HCl. Die Werte für Spermin lagen bei 3,2 μm , für Spermin-HCl bei 2,7 μm gegenüber der Kontrolle, die bei 6,2 μm lag. Damit kann ausgeschlossen werden, dass der Spermin-induzierte Stomatatschluss auf einen reinen pH-Effekt zurückgeführt werden kann.

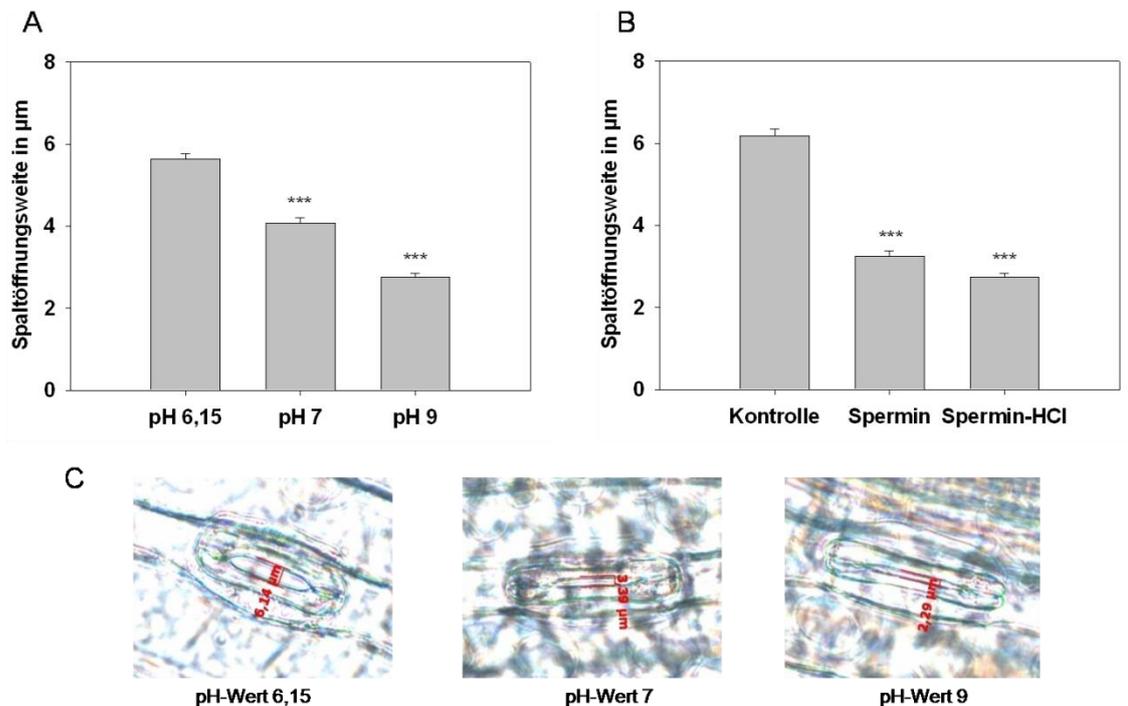


Abbildung 17: pH-Wert Abhängigkeit der durch Spermin induzierten Schließung der Stomata. Epidermisstreifen wurden von vier bis sechs Wochen alten Gerstenpflanzen (cv. Golden Promise) isoliert und die Spaltöffnungsweite nach vierstündiger Inkubation, davon zwei Stunden in A) Öffnungspuffer mit unterschiedlichen pH-Werten (pH 6,15, 7 oder 9), und B) Spermin oder Spermin-HCl (je 10 μl in Öffnungspuffer, pH 6,21 bzw. 6,15) unter dem Mikroskop gemessen. Als Kontrollen dienten Epidermisstreifen, welchen die gleiche Menge Wasser zugesetzt wurde. Daten sind Mittelwerte und Standardfehler aus drei unabhängigen Experimenten mit jeweils $n > 30$. C) Signifikante Unterschiede sind gekennzeichnet mit * = $P < 0,05$, ** = $P < 0,01$, *** = $P < 0,001$.

3.1.4 Einfluss von Inhibitoren der Polyaminoxidase auf die spermininduzierte Schließung der Stomata von Gerstenpflanzen

In den vorangegangenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass die untersuchten Polyamine und speziell Spermin in der Lage sind, Spaltöffnungen der Gerstensorte Golden Promise zu schließen. Dieser reversible Prozess konnte auch für die Sorten

Scarlett und Tadmor gezeigt werden. Zudem konnte kein additiver oder synergistischer Effekt mit ABA beobachtet werden. Die Versuche mit unterschiedlichen pH-Werten legten die Vermutung nahe, dass der Prozess des Spermin-induzierten Stomataschlusses pH-Wert abhängig ist. Dies konnte aber ausgeschlossen werden. Weitere mögliche Komponenten der Sperminwirkung sollten in den folgenden Versuchen analysiert werden.

Zunächst wurde untersucht, ob die Katabolisierung des Spermins durch Polyaminoxidasen (PAOs) eine Rolle spielt. Hierzu wurden Epidermisstreifen neben Spermin mit dem PAO-Inhibitor Guazatinacetat inkubiert (Abb. 18a). Guazatinacetat alleine wirkte sich nicht reproduzierbar auf die stomatäre Öffnungsweite aus. Der Inhibitor hatte jedoch einen deutlichen Effekt auf die Spermin-induzierte Schließung der Stomata. Während auch hier wieder Spermin zu einem Stomataschluss führte, wurde diese Reaktion verhindert, wenn der Inkubationspuffer zusätzlich Guazatinacetat enthielt. Dieses Ergebnis zeigt, dass der PAO-vermittelte Abbau essentiell für den Spermineffekt ist.

In einem weiteren Ansatz wurde der Effekt der PAO-Hemmung auf den ABA-induzierten Stomataschluss getestet. Interessanterweise zeigte Guazatinacetat eine vergleichbare Wirkung wie bei Spermin (Abb. 18b). Wie erwartet führte ABA allein zum Stomataschluss, während Guazatinacetat die ABA-induzierte Schließung verhinderte. Dieses Ergebnis zeigt, dass PAOs eine essentielle Rolle in der Reaktion auf ABA spielen.

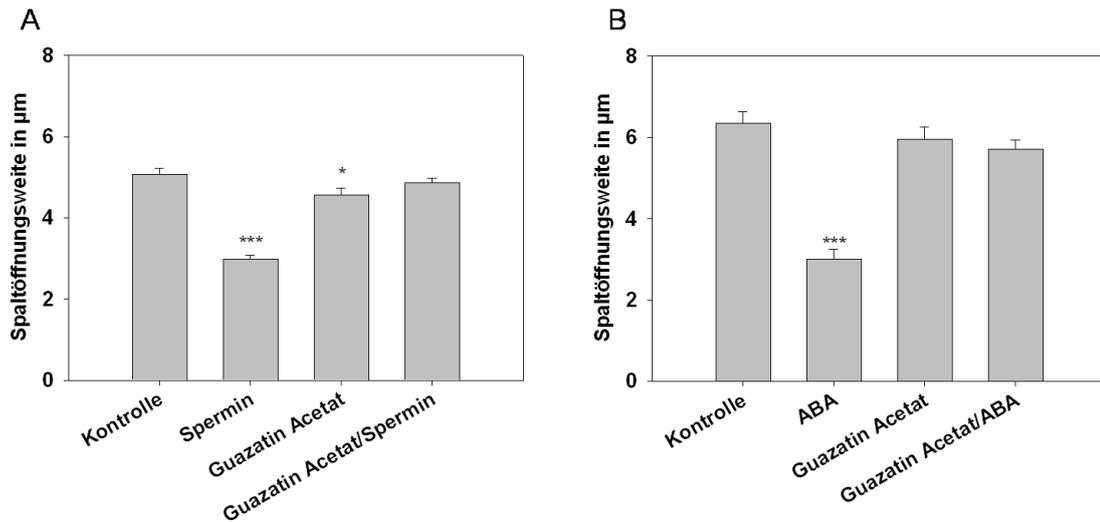


Abbildung 18: Einfluss des Polyaminoxidase-Inhibitors Guazatinacetat auf die Spermin-induzierte Schließung der Stomata. Epidermisstreifen wurden von vier bis sechs Wochen alten Gerstenpflanzen (cv. Golden Promise) isoliert und die Spaltöffnungsweite nach vierstündiger Inkubation, davon zwei Stunden mit Spermin, ABA oder der jeweiligen Kombination mit Guazatinacetat, gemessen. A) Behandlung der Epidermisstreifen mit Spermin, Guazatinacetat oder einer Kombination aus beiden. B) Inkubation der Epidermisstreifen mit ABA, Guazatinacetat oder einer Kombination aus beiden. Daten sind Mittelwerte und Standardfehler aus drei unabhängigen Experimenten mit jeweils $n > 30$. Signifikante Unterschiede sind gekennzeichnet mit * = $P < 0.05$, ** = $P < 0.01$, *** = $P < 0.001$.

Spermin wird neben der Sperminoxidase auch durch das Enzym PAO oxidiert. Bei diesem Schritt entsteht neben 4-Aminobutanal oder (3-Aminopropyl)-4-Aminobutanal auch 1,3-Diaminopropan und H_2O_2 (Cona et al. 2006; Fig. 2). Die Bildung von H_2O_2 durch Sperminoxidation führt zu der Frage, ob die Bildung von ROS an der Stomataantwort gegenüber externem Spermin beteiligt ist. Zur Untersuchung der Rolle von ROS beim Spermin-induzierten Stomataschluss wurde dem Puffer Ascorbinsäure zum Abfangen der ROS zugesetzt. Ascorbinsäure alleine hatte keinen Einfluss auf die Öffnungsweite (Abb. 19). Ohne Ascorbinsäurezugabe führte eine Behandlung mit $10 \mu M$ Spermin wie erwartet zu einer Reduzierung der Spaltöffnungsweite. Die Zugabe von 1 mM Ascorbinsäure verringerte diese Reaktion, so dass die Weite der Spaltöffnungen $4,7 \mu m$ betrug. Eine Erhöhung der Ascorbinsäurekonzentration auf 5 mM führte zu keiner weiteren Hemmung der Schließung.

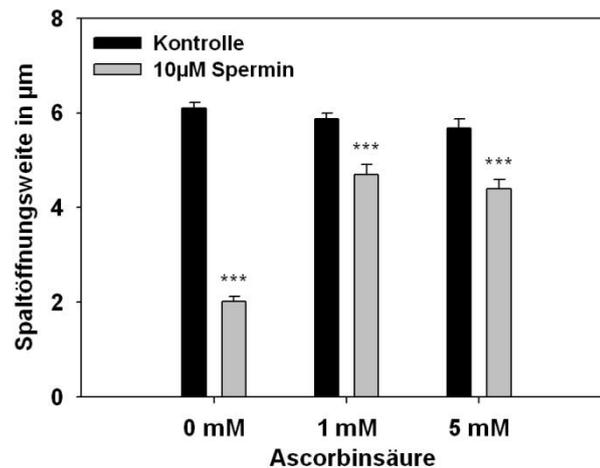


Abbildung 19: Einfluss von Ascorbinsäure auf die Spermin-induzierte Schließung der Stomata. Isolierte Epidermistreifen von vier bis sechs Wochen alten Gerstenpflanzen (cv. Golden Promise) wurden mit unterschiedlichen Ascorbinsäurekonzentrationen mit und ohne 10 µM Spermin inkubiert. Die Spaltöffnungsweite wurde nach vierstündiger Inkubationsdauer, davon zwei Stunden mit Spermin und der entsprechenden Konzentration Ascorbinsäure, unter dem Mikroskop gemessen. Daten sind Mittelwerte und Standardfehler aus drei unabhängigen Experimenten mit jeweils $n > 30$. Signifikante Unterschiede sind gekennzeichnet mit * = $P < 0.05$, ** = $P < 0.01$, *** = $P < 0.001$.

Eine weitere Quelle von ROS sind membranständige NADPH Oxidasen. Der Effekt von Ascorbat auf den Spermin-induzierten Stomataschluss könnte daher auf eine Aktivität dieses Enzyms hinweisen. Daher wurde in einem weiteren Experiment der Effekt des NADPH Oxidase-Inhibitors Diphenyleniodoniumchlorid (DPI) untersucht (Abb. 20). Die Inkubation mit 10 µM DPI allein führte zu einer leichten, aber signifikanten Reduktion der Spaltöffnungsweite. Eine Sperminbehandlung führte zu einer Schließung um 53%. Eine Kombination von DPI und Spermin führte zu einem tendenziell geringeren Spaltöffnungsschluss, dies war aber nicht signifikant. Die Ergebnisse zeigen, dass die Inhibierung der NADPH-Oxidase kaum einen Einfluss auf den Spermin-vermittelten Stomataschluss von Gerste hat.

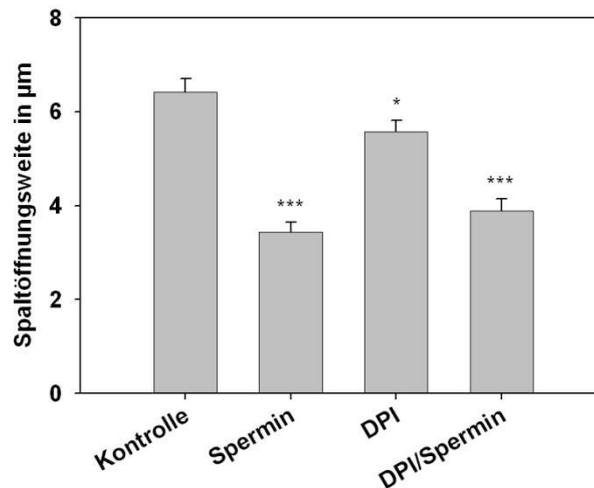


Abbildung 20: Einfluss des NADPH Oxidase-Inhibitors Diphenyliodoniumchlorid (DPI) auf die Spermin-induzierte Schließung der Stomata. Isolierte Epidermisstreifen von vier bis sechs Wochen alten Gerstenpflanzen (Golden Promise) wurden zwei Stunden mit 10 μM DPI und 10 μM Spermin inkubiert. Die Spaltöffnungsweite wurde nach insgesamt vier Stunden Inkubation in Öffnungspuffer, davon zwei Stunden mit Spermin, DPI oder einer Kombination aus Spermin und DPI unter dem Mikroskop gemessen. Daten sind Mittelwerte und Standardfehler aus drei unabhängigen Experimenten mit jeweils $n > 30$. Signifikante Unterschiede sind gekennzeichnet mit * = $P < 0.05$, ** = $P < 0.01$, *** = $P < 0.001$.

3.1.4.1 Nachweis reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) nach Sperminbehandlung bei Gerstenpflanzen

Die vorhergehenden Inhibitorexperimente deuteten auf eine Beteiligung reaktiver Sauerstoffspezies am Spermin-induzierten Stomataschluss. In einem nächsten Schritt sollten diese direkt nachgewiesen werden. Die Akkumulation von Superoxidradikalen sollte durch Färbung mit Nitroblau-Tetrazolium (NBT) visualisiert werden. Es konnten in den nicht mit Spermin behandelten Kontrollen intensivere Superoxidradikalfärbungen beobachtet werden (Abb. 21a); mit Spermin behandelte Epidermisstreifen zeigten jedoch interessanterweise keine blaue Färbung (Abb. 21b). Dieses Ergebnis deutet auf eine verminderte Entstehung oder einen Abbau von Superoxidradikalen durch Spermin.

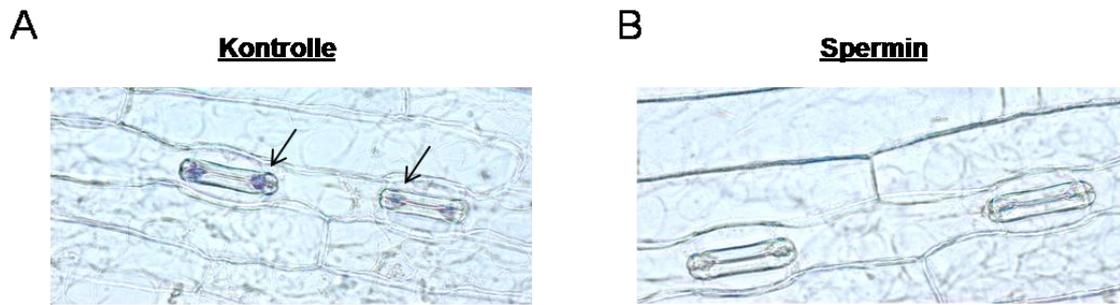


Abbildung 21: Färbung von Superoxidradikalen in Epidermisstreifen mittels Nitroblau-Tetrazolium (NBT). Epidermisstreifen wurden insgesamt vier Stunden in Öffnungspuffer inkubiert, davon zwei Stunden mit A) Wasser als Kontrolle oder B) 10 µM Spermin. Anschließend wurden die Epidermen eine Stunde in einer NBT-Lösung zum Färben von Superoxidradikalen inkubiert.

Um eine mögliche H_2O_2 -Produktion in Schließzellen durch die Applikation von Spermin zu untersuchen, wurden Epidermisstreifen mit dem H_2O_2 -Indikator 3,3-Diaminobenzidin (DAB) angefärbt. Es konnten jedoch keine visuellen Unterschiede zwischen sperminbehandelten und Kontrollproben detektiert werden, wobei Sperminkonzentrationen von 10 - 1000 µM getestet wurden (Abb. 22). Dies könnte unter anderem an einer unzureichenden Sensitivität der DAB-Methode liegen.

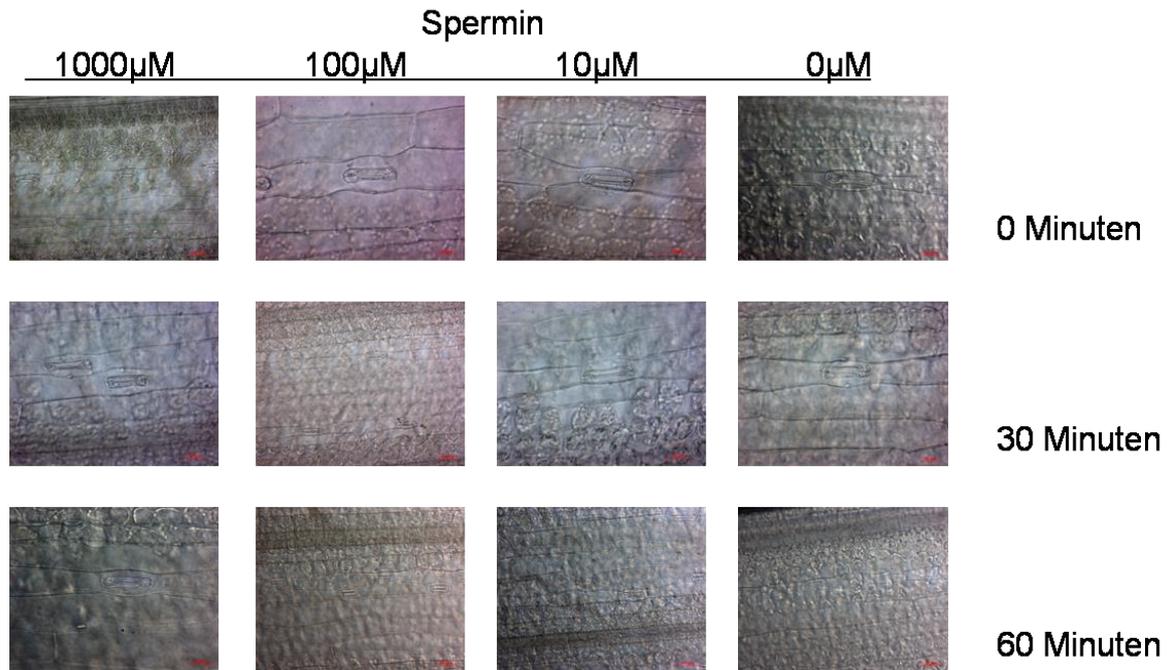


Abbildung 22: Färbung von H_2O_2 in Epidermisstreifen mittels 3,3-Diaminobenzidin (DAB). Epidermisstreifen, wurden insgesamt vier Stunden in Öffnungspuffer inkubiert, zwei Stunden davon mit den jeweiligen Sperminkonzentrationen. Im Anschluss erfolgte die Färbung von H_2O_2 mit DAB für 0, 30 oder 60 Minuten.

Um die Produktion von H_2O_2 in Schließzellen mit höherer Sensitivität zu untersuchen, wurden Experimente mit dem sensitiveren fluoreszierenden ROS-Farbstoff 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein Diacetat (H_2DCFDA) durchgeführt. Als Positivkontrolle wurde zunächst der Effekt von H_2O_2 untersucht. Wie erwartet verringerten 10 μ M H_2O_2 die stomatäre Öffnungsweite von 6,4 auf 4,1 μ m (Abb. 23a). Die Zugabe von H_2O_2 erhöhte parallel die DCFDA-Fluoreszenz der Schließzellen um das 1,5-fache. Erwartungsgemäß führte auch Spermin zu einer Schließung der Stomata (3,4 μ m). Daneben bewirkte Spermin eine Erhöhung der DCFDA-Fluoreszenz in den Schließzellen in gleichem Maße wie die H_2O_2 -Behandlung (Abb. 23b). Das Ergebnis deutet auf eine Beteiligung der Produktion von H_2O_2 durch PAOs in der Regulation der Spaltöffnungsweite.

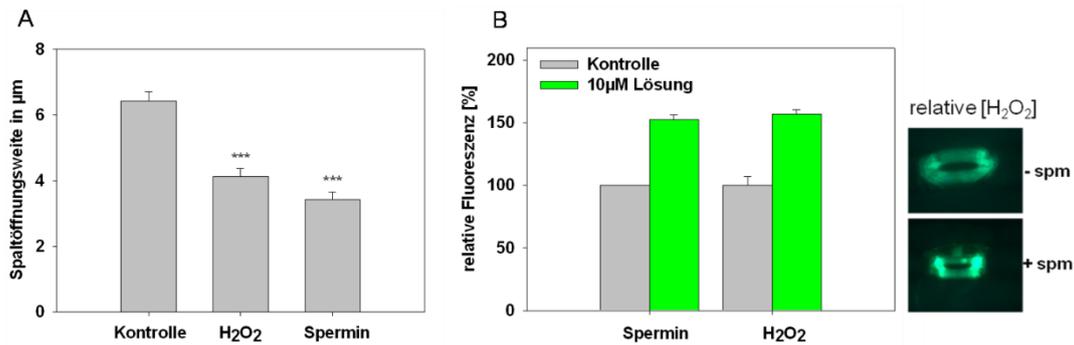


Abbildung 23: Wirkung von Spermin und H₂O₂ auf Spaltöffnungen und Fluoreszenz der Schließzellen nach Färbung mit 2',7'-Dichlorofluorescein Diacetat (H₂DCFDA).

A) Behandlung der Epidermisstreifen mit 10 µM Spermin oder H₂O₂. Epidermisstreifen wurden insgesamt vier Stunden in Öffnungspuffer inkubiert, davon zwei Stunden mit Spermin oder H₂O₂. Die Spaltöffnungsweite wurde unter dem Mikroskop gemessen. B) Relative Fluoreszenz der jeweiligen mittels H₂DCFDA gefärbten Epidermisstreifen. Daten sind Mittelwerte und Standardfehler aus drei unabhängigen Experimenten mit jeweils n > 30. Signifikante Unterschiede sind gekennzeichnet mit * = P < 0.05, ** = P < 0.01, *** = P < 0.001.

3.1.4.2 Beteiligung von extrazellulärem Calcium an der Spermin-induzierten Schließung von Stomata

Für eine Reihe von Stimuli ist bekannt, dass eine Erhöhung der $[Ca^{2+}]_{cyt}$ durch Ca^{2+} -Influx für die Auslösung des Stomataschlusses notwendig ist. Dies wurde für Spermin mit dem Ca^{2+} -Chelator Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-tetraessigsäure (EGTA) getestet. Inkubation der Epidermisstreifen in EGTA-haltigem Medium verhinderte den durch Spermin induzierten Stomataschluss teilweise (Abb. 24). Spermin reduzierte die Öffnungsweite um 57%, Spermin in Kombination mit EGTA bewirkte nur eine Reduzierung der Spaltöffnungen um 21%. Eine Behandlung mit EGTA verhinderte die durch Spermin induzierte Stomataschließung jedoch nicht komplett. Dies deutet darauf hin, dass die Freisetzung von Ca^{2+} aus internen Speichern, wie dem ER, der Vakuole oder den Mitochondrien hier ebenfalls eine Rolle spielen könnte oder dass der Prozess teilweise Ca^{2+} -unabhängig ist.

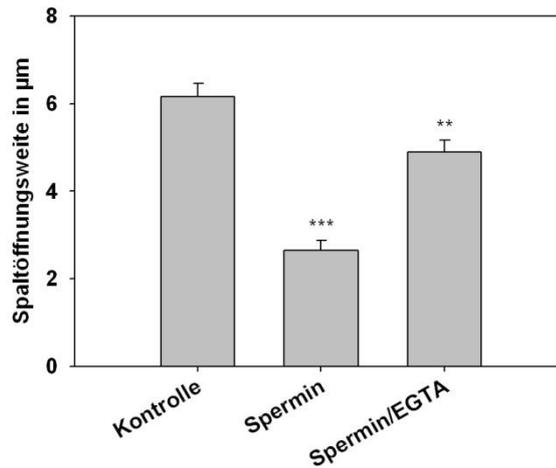


Abbildung 24: Einfluss des Calciumchelators EGTA auf die Schließung der Stomata nach Sperminapplikation. Die Epidermisstreifen wurden zunächst zwei Stunden in Öffnungspuffer inkubiert. Die Spaltöffnungsweite wurde nach weiteren zwei Stunden Inkubation mit Spermin, EGTA oder der Kombination von Spermin und EGTA unter dem Mikroskop gemessen. Daten sind Mittelwerte und Standardfehler aus drei unabhängigen Experimenten mit jeweils $n > 30$. Signifikante Unterschiede sind gekennzeichnet mit * = $P < 0.05$, ** = $P < 0.01$, *** = $P < 0.001$.

3.2 Einfluss von Spermin auf zytosolische Calciumkonzentrationen in Pflanzen

Um eine mögliche Rolle von Spermin in der Ca^{2+} -Signalübermittlung zu untersuchen, wurden Gersten- und Arabidopsispflanzen auf unterschiedlichen Ebenen analysiert.

3.2.1 Einfluss von Spermin auf die zytosolische Calciumkonzentration intakter Gerstenpflanzen

Da Spermin zum Schließen von Stomata, einer häufig durch $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ gesteuerter Reaktion, führt, und dieser Prozess durch EGTA inhibiert wurde, wurde untersucht, ob Spermin einen Einfluss auf die $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ von Gerstepflanzen hat. $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ -Messungen sind bei Gerste bisher nicht beschrieben. Für die Messung wurden transgene Gerstenkeimlinge der Sorte Golden Promise verwendet, die das *Apoaequorin*-Gen unter Kontrolle des ZmUbi-Promoters exprimierten. Apoaequorin wurde mit Coelenterazin zu Aequorin rekonstituiert. Die Messung der Ca^{2+} -abhängigen Aequorin-Lumineszenz

wurde mit einer auf einer Dunkelkammer montierten Photonenzählkamera durchgeführt. Um die Funktionalität des Aequorins zu überprüfen, wurde ein Kälteschock (0°C) durch Absenken der Temperatur der Trägerplatte, auf welcher sich die zu untersuchenden Pflanzen befanden, appliziert. Dieser führt bei Arabidopsispflanzen zu einem sofortigen $[Ca^{2+}]_{cyt}$ -Signal (Knight et al 1996). Hierbei konnte sowohl im Spross als auch in der Wurzel eine Lumineszenz detektiert werden (Abb. 25). Eine bereits vor dem Kälteschock auftretende Lumineszenz wurde wahrscheinlich durch den mit dem Umsetzen in die Dunkelkammer verbundenen Berührungszreiz verursacht. Nach einer kurzen Regenerationsphase (120 s) sank diese Fluoreszenz wieder ab. Mit Beginn des Kälteschocks (T 120 s) zeigte sich vor allem im Spross ein Anstieg der $[Ca^{2+}]_{cyt}$. In der Wurzel wurde eine geringere Reaktion auf den Kälteschock als im Spross beobachtet.

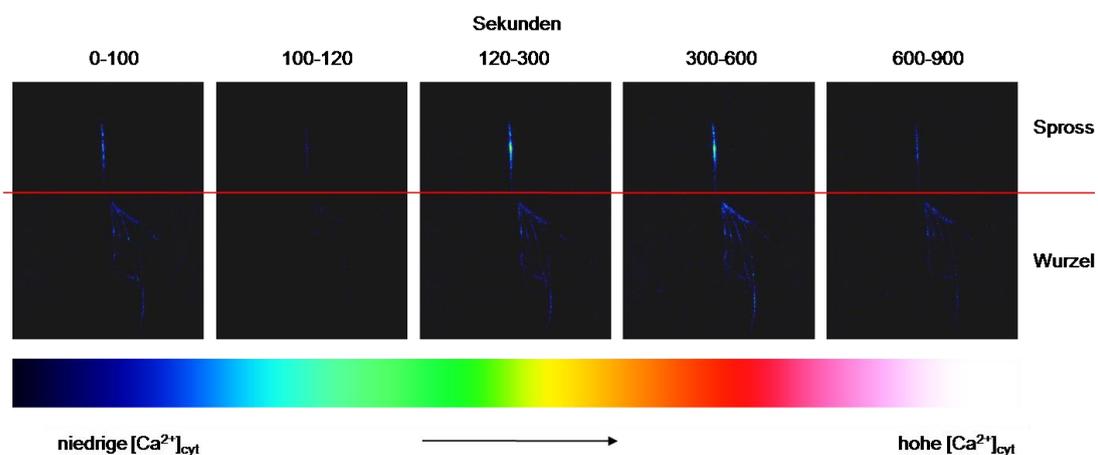


Abbildung 25: Aequorin-basierte Messung der $[Ca^{2+}]_{cyt}$ nach Kälteschock an 7 Tage alten Gerstekeimlingen. Die Keimlinge wurden einem Kälteschock von 0°C ab Zeitpunkt 120 s unterzogen. Die Messung der Aequorin-Lumineszenz erfolgte über einen Zeitraum von 15 Minuten mittels einer Photonenzählkamera. Die Abbildungen zeigen kumulative Falschfarbenbilder der $[Ca^{2+}]_{cyt}$ über die angegebenen Zeiträume.

Der Einfluss von externem Spermin auf die $[Ca^{2+}]_{cyt}$ von Gerstekeimlingen sollte in verschiedenen Ansätzen untersucht werden. Im ersten Ansatz wurden die Keimlinge auf eine Petrischale gelegt und Spermin in einer Konzentration von 1 mM aufgesprüht (Abb. 26). Diese Behandlung verursachte einen sofortigen Anstieg der $[Ca^{2+}]_{cyt}$ in den Wurzeln (Abb. 26a,b). Der Beginn der Reaktion konnte nicht aufgezeichnet werden, da die Messung erst nach dem Besprühen gestartet werden konnte. Das Signal fiel zunächst schnell und daraufhin langsamer ab und war zum Ende der Messung nach 24 Minuten noch erhöht. Im Spross konnte lediglich unmittelbar nach der Behandlung eine minimale Reaktion beobachtet werden. Über den weiteren Messzeitraum zeigte sich im Spross keine erhöhte $[Ca^{2+}]_{cyt}$.

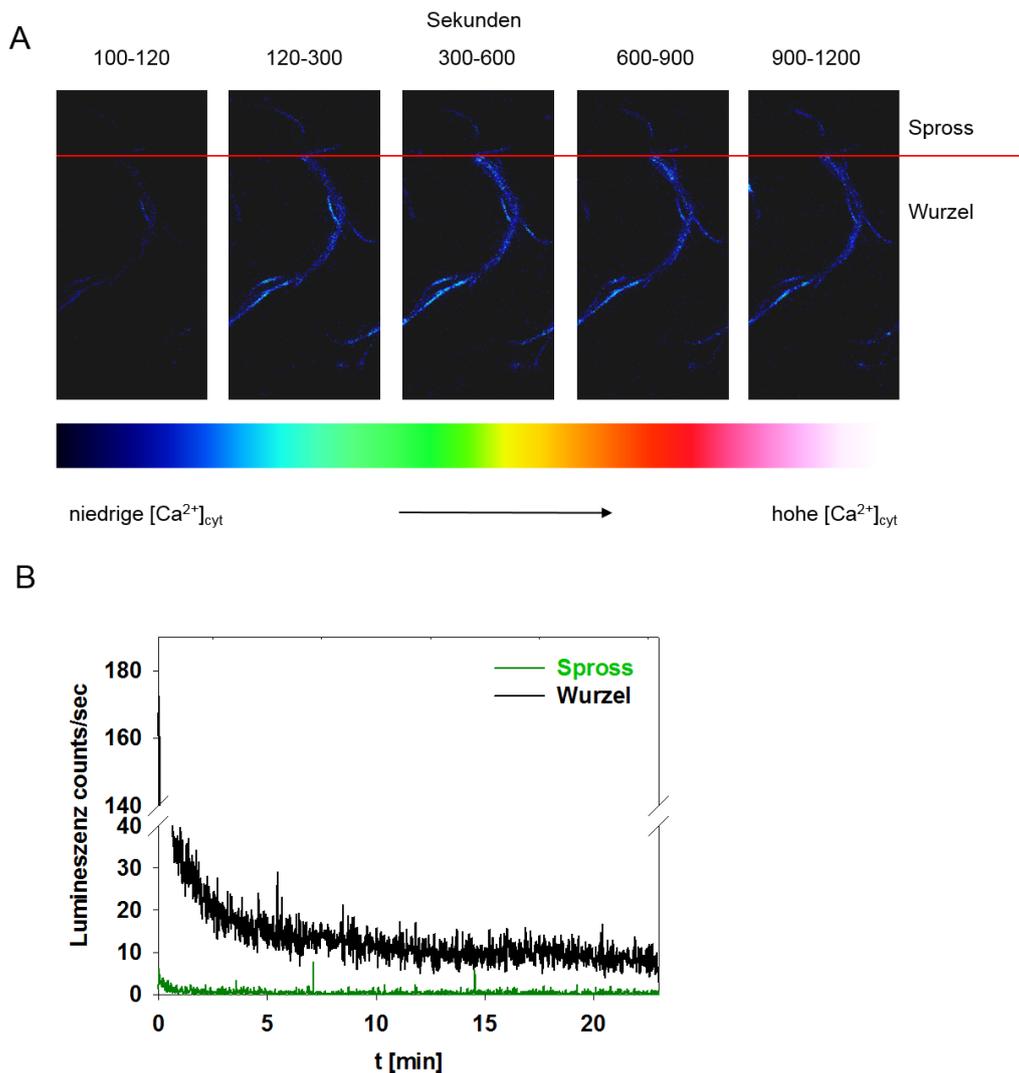


Abbildung 26: Aequorin-basierte Messung der $[Ca^{2+}]_{cyt}$ nach Applikation von 1 mM Spermin zu 7 Tage alten Gerstekeimlingen. Die Messung der Aequorin-Lumineszenz erfolgte über einen Zeitraum von 24 Minuten mit einer Photonen-zählkamera. A) Kumulative Falschfarbenbilder des mit Spermin behandelten Keimlings. B) Verlauf der Lumineszenz nach Besprühen der Keimlinge mit Spermin.

Die relativ geringe Sensitivität der Photonen-zählkamera sowie die Größe der Gerstenpflanzen erschwerten eine weitergehende Analyse der Spermin-induzierten $[Ca^{2+}]_{cyt}$ -Reaktion. Daher wurden weitere Untersuchungen an *Apoaequorin*-exprimierenden *Arabidopsis thaliana* durchgeführt. Die Größe der Keimlinge erlaubte die Messung der Lumineszenz in einem Röhrenluminometer, welches eine wesentlich höhere Sensitivität als die photonenzählende Kamera besitzt.

3.2.2 Einfluss von Spermin auf die zytosolische Calciumkonzentration intakter *Arabidopsis thaliana*-Sämlinge

Zunächst wurde die Veränderung der $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$ durch verschiedene Sperminkonzentrationen an sieben Tage alten Apoaequorin-exprimierenden Arabidopsiskeimlingen analysiert. Abbildung 27 zeigt, dass intakte Keimlinge mit einem $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$ -Anstieg auf extern appliziertes Spermin reagieren. Die Höhe der Veränderung der $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$ stieg mit ansteigender Sperminkonzentration an. Die Reaktion erfolgte direkt auf die Sperminapplikation. Zeigten die Keimlinge bei Konzentrationen von 0,1 mM und 1 mM Spermin nur einen schnellen Anstieg ihrer $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$, so konnte bei einer Sperminkonzentration von 10 mM nach dem beobachteten schnellen Anstieg innerhalb der ersten 60 s ein weiterer langsamer Anstieg der $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$ gemessen werden. Die Basislinie war bei allen Sperminkonzentrationen zum Ende der Messung (500 s) noch erhöht. In der Wasserkontrolle wurde keine wesentliche Reaktion gemessen. Da ab einer Konzentration von 1 mM Spermin große Veränderungen in der $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$ beobachtet wurden, wurde diese Konzentration für die folgenden Versuche verwendet.

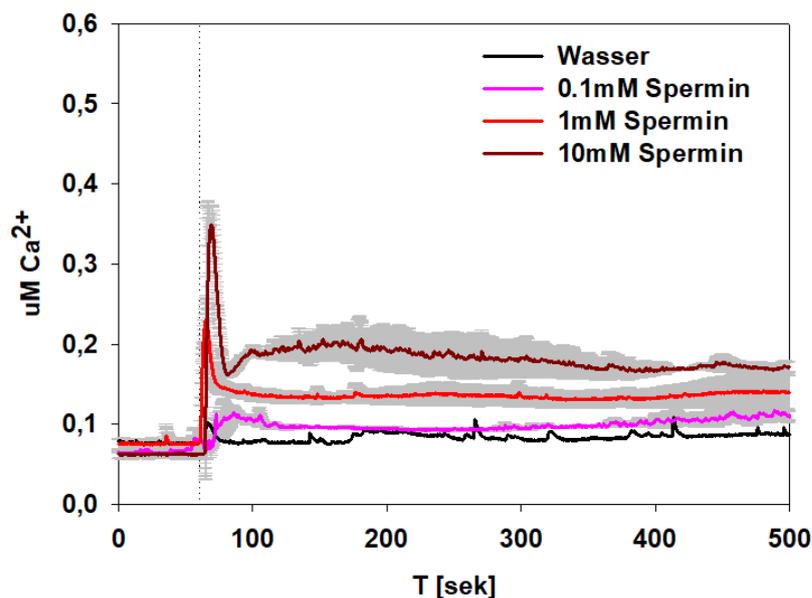


Abbildung 27: Reaktion der $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$ 7 Tage alter Arabidopsiskeimlinge in Abhängigkeit der Sperminkonzentration. Die Keimlinge wurden bei $T=60$ sec mit 0,1, 1 oder 10 mM Spermin oder Wasser als Kontrolle behandelt. Die Messung der Aequorin-Lumineszenz erfolgte über einen Zeitraum von 500 Sekunden an einem Luminometer. Die Daten sind Mittelwerte und Standardfehler (grau hinterlegt) von jeweils drei biologischen Wiederholungen gemessen an drei verschiedenen Tagen.

Der Spermin-induzierte Stomataschluss wurde durch Hemmung der Polyaminoxidase mittels Guazatinacetat inhibiert (Abb. 18). Es wurde daher untersucht, ob dies mit einer Änderung des Spermin-induzierten Ca^{2+} -Signals einhergeht. In Abbildung 28 ist die Reaktion der $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ auf 1 mM Spermin in Kombination mit Guazatinacetat dargestellt. Die Keimlinge wurden vor dem Versuch 30 Minuten in 5 mM Guazatinacetat inkubiert. Die Hemmung der PAO führte zu keiner Veränderung der $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ -Antwort auf externes Spermin im Vergleich zu nicht inhibierten Keimlingen. Die erste, unmittelbar auf Zugabe von Spermin folgende Erhöhung $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ betrug $0,28 \mu\text{M}$. Die $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ kehrte bis zum Ende der Messung nicht auf die ursprüngliche Basislinie zurück, wie dies auch bei nicht inhibierten Pflanzen der Fall war (Abb. 27).

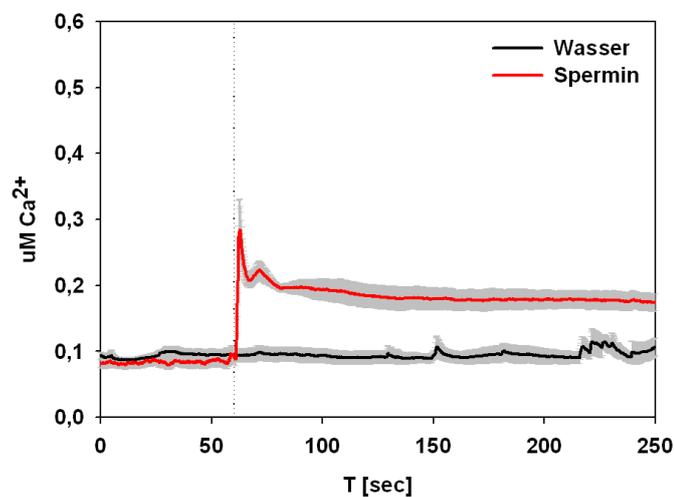


Abbildung 28: Aequorin-basierte Messung der $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ nach Vorinkubation mit Guazatinacetat und Applikation von 1 mM Spermin zu 7 Tage alten Arabidopsiskeimlingen. Die Vorinkubation der Keimlinge erfolgte jeweils 30 Minuten vor der Messung in 5 mM Guazatinacetat. Die Messung der Aequorin-Lumineszenz wurde über einen Zeitraum von 250 Sekunden an einem Luminometer durchgeführt. Daten sind Mittelwerte und Standardfehler von jeweils drei biologischen Wiederholungen gemessen an drei verschiedenen Tagen. Kontrollpflanzen wurden mit Wasser behandelt.

Da nachgewiesen wurde, dass Ascorbinsäure eine Hemmung des Spermin-induzierten Stomataschlusses bewirkt (Abb.19), sollte nun untersucht werden, ob dies auch für Spermin-induzierte Ca^{2+} -Signale zutrifft. Abbildung 29 zeigt die Ergebnisse von Versuchen an intakten Arabidopsiskeimlingen, welche vor Sperminapplikation in Ascorbinsäure inkubiert wurden. Sowohl bei einer Konzentration von 1 mM (pH 3) als auch 5 mM (pH 6) Ascorbinsäure war die maximale $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ nach Applikation von 1 mM Spermin nicht verändert. Die Einstellung des pH-Wertes der Ascorbinsäure (5 mM) auf pH 6 führte dazu, dass die erste Phase der Reaktion auf 1 mM Spermin deutlich höher

ausfiel als bei der Vorinkubation in 5 mM Ascorbinsäure mit pH 3. Auch hier erfolgte eine sofortige Antwort auf das extern applizierte Spermin; ein zweiter Anstieg konnte jedoch nicht beobachtet werden.

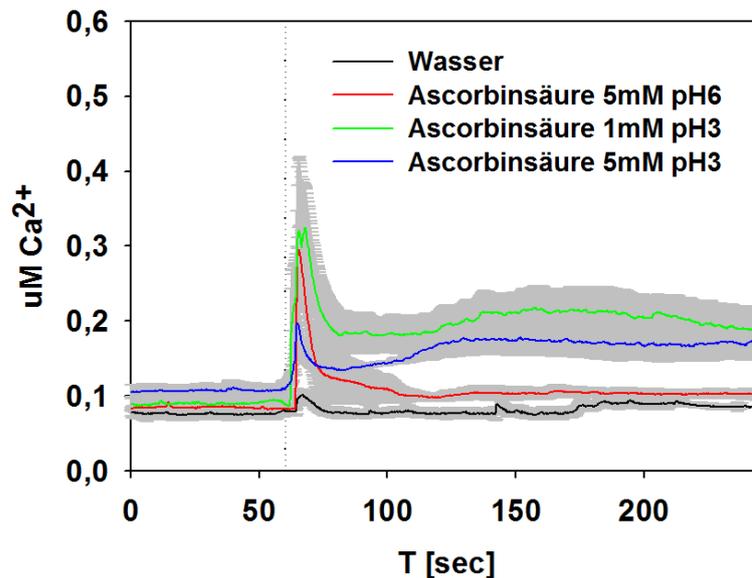


Abbildung 29: Aequorin-basierte Messung der $[Ca^{2+}]_{cyt}$ nach Vorinkubation mit Ascorbinsäure mit unterschiedlichen pH Werten und Applikation von 1 mM Spermin zu 7 Tage alten Arabidopsiskeimlingen. Die Vorinkubation der Keimlinge mit Ascorbinsäure erfolgte jeweils 30 Minuten vor der Messung. Die Messung der Aequorin-Lumineszenz wurde über einen Zeitraum von 250 Sekunden an einem Luminometer durchgeführt. Daten sind Mittelwerte und Standardfehler von jeweils drei biologischen Wiederholungen gemessen an drei verschiedenen Tagen.

Der Ca^{2+} -Chelator EGTA inhibierte den Spermin-induzierten Stomataschluss teilweise (Abb. 24), was auf eine Beteiligung von externem Ca^{2+} hinweist. Daher wurde untersucht, ob auch die durch Spermin induzierte Änderung der $[Ca^{2+}]_{cyt}$ abhängig von externem Ca^{2+} ist. Durch die Inkubation der Arabidopsiskeimlinge in 10 mM EGTA (pH 7) wurde der Reaktionsverlauf abgeschwächt (Abb. 30). Sowohl die erste Reaktion auf 1 mM Spermin als auch die zweite Phase waren geringer als im Versuch ohne EGTA-Vorinkubation. Im Gegensatz zu EGTA-freier Inkubation war das Ausgangsniveau der $[Ca^{2+}]_{cyt}$ nach ca. einer Minute wieder erreicht.

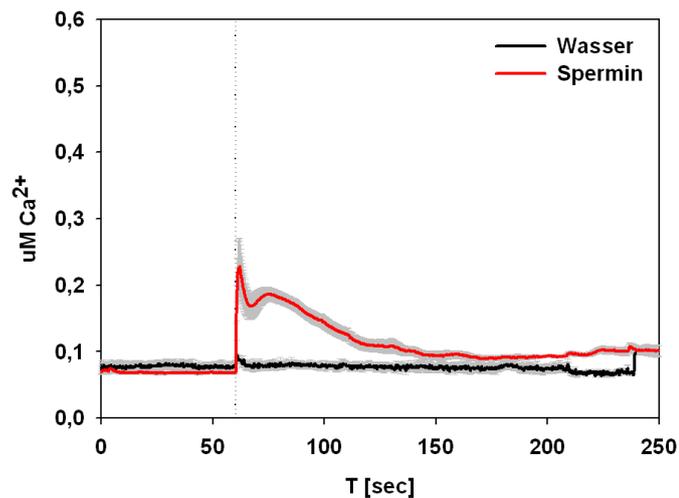


Abbildung 30: Aequorin-basierte Messung der $[Ca^{2+}]_{cyt}$ nach Vorinkubation mit EGTA und Applikation von Spermin (1 mM) zu 7 Tage alten Arabidopsiskeimlingen. Die Vorinkubation der Keimlinge erfolgte 30 Minuten vor der Messung in 10 mM EGTA (pH 7). Die Messung der Aequorin-Lumineszenz wurde über einen Zeitraum von 250 Sekunden an einem Luminometer durchgeführt. Daten sind Mittelwerte und Standardfehler von jeweils drei biologischen Wiederholungen gemessen an drei verschiedenen Tagen. Kontrollpflanzen wurden mit Wasser behandelt.

3.2.3 Einfluss von Spermin auf die zytosolische Calciumkonzentration von Spross und Wurzel in *Arabidopsis thaliana*

Aufgrund der Ergebnisse mit Gerste (Abb. 26), in denen eine unterschiedliche Reaktion der $[Ca^{2+}]_{cyt}$ von Spross und Wurzel gefunden wurde, sollte nun untersucht werden, ob Spermin einen unterschiedlichen Einfluss auf Ca^{2+} -Signale in Spross und Wurzel von Arabidopsis hat. Eine Trennung der Keimlinge in Spross und Wurzel zeigte einen Unterschied im Reaktionsverlauf beider Pflanzenteile. Bei dem mit 1 mM Spermin behandelten Spross konnte nur eine Reaktionsspitze beobachtet werden (Abb. 31a). Die Antwort der Wurzel ähnelte dagegen dem biphasischen Verlauf von kompletten Keimlingen (Abb. 31b), wobei hier der zweite Anstieg der $[Ca^{2+}]_{cyt}$ kürzer und höher verlief als im Versuch mit kompletten Pflanzen (Abb. 27). Es konnte zunächst ein schneller Anstieg detektiert werden. Im Anschluss kam es zu einem weiteren Anstieg mit einem durchschnittlich 100 Sekunden andauernden Verlauf. Danach verringerte sich die $[Ca^{2+}]_{cyt}$ wieder, bis eine Basislinie erreicht war, die über der vor der Sperminapplikation lag.

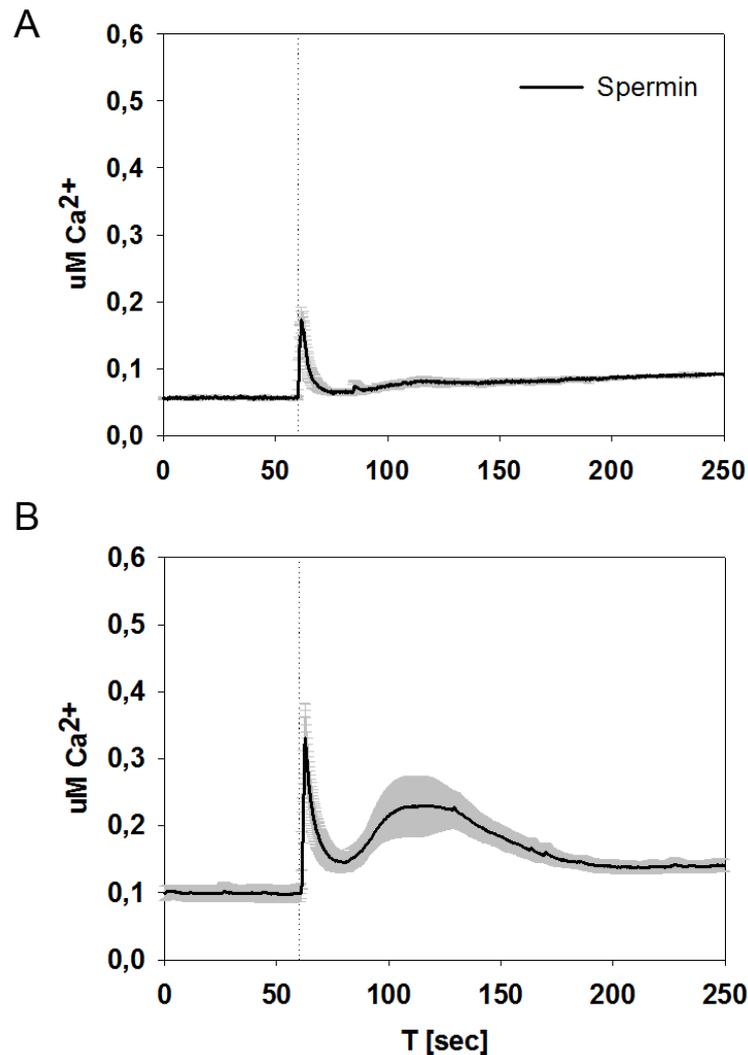


Abbildung 31: Aequorin-basierte Messung der $[Ca^{2+}]_{cyt}$ nach Sperminapplikation zu in Spross und Wurzel getrennte 7 Tage alte Arabidopsiskeimlinge. Applikation von 1 mM Spermin erfolgte separat zu A) Spross und B) Wurzel. Die Messung der Aequorin-Lumineszenz wurde über einen Zeitraum von 250 Sekunden an einem Luminometer durchgeführt. Spross und Wurzel wurden zwei Stunden vor der Messung geteilt. Daten sind Mittelwerte von jeweils drei biologischen Wiederholungen gemessen an drei verschiedenen Tagen.

Da die $[Ca^{2+}]_{cyt}$ in separierten Sprossen und Wurzeln unterschiedlich auf Spermin reagierte, wurde das räumliche Auftreten des Ca^{2+} -Signals mit Hilfe der Photonenzählkamera analysiert. Sieben Tage alte Arabidopsiskeimlinge wurden dazu mit Coelenterazin rekonstituiert. Nach Erhalt einer stabilen Basislinie der Lumineszenz wurden die Keimlinge mit einer 1 mM Sperminlösung besprüht, so dass die Pflanzen komplett in der Lösung lagen. Unmittelbar nach Zugabe des Spermins zeigte sich bei allen Keimlingen ein Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration der Wurzeln und in sehr geringem Maß auch im Spross (Abb. 32a). Diesem ersten Anstieg folgte 1,5

Minuten nach Sperminzugabe eine zweite Erhöhung der Lumineszenz in der Wurzel. Eine dritte Veränderung der Lumineszenz konnte in einem Zeitraum von fünf bis zwanzig Minuten nach der Sperminzugabe im Spross beobachtet werden. Nach 23 Minuten waren sowohl im Spross als auch in der Wurzel die Lumineszenzwerte auf Höhe des Ausgangswertes (Abb. 32b) zurückgegangen. Diese Reaktionen wurden anhand von Falschfarbenbildern visuell dargestellt (Abb. 32a). Deutlich zu sehen ist ein Anstieg der Lumineszenz in den ersten 100 Sekunden sowohl im Spross als auch in der Wurzel, gefolgt von den beiden zu unterschiedlichen Zeiten detektierten Anstiegen in Wurzel und Spross.

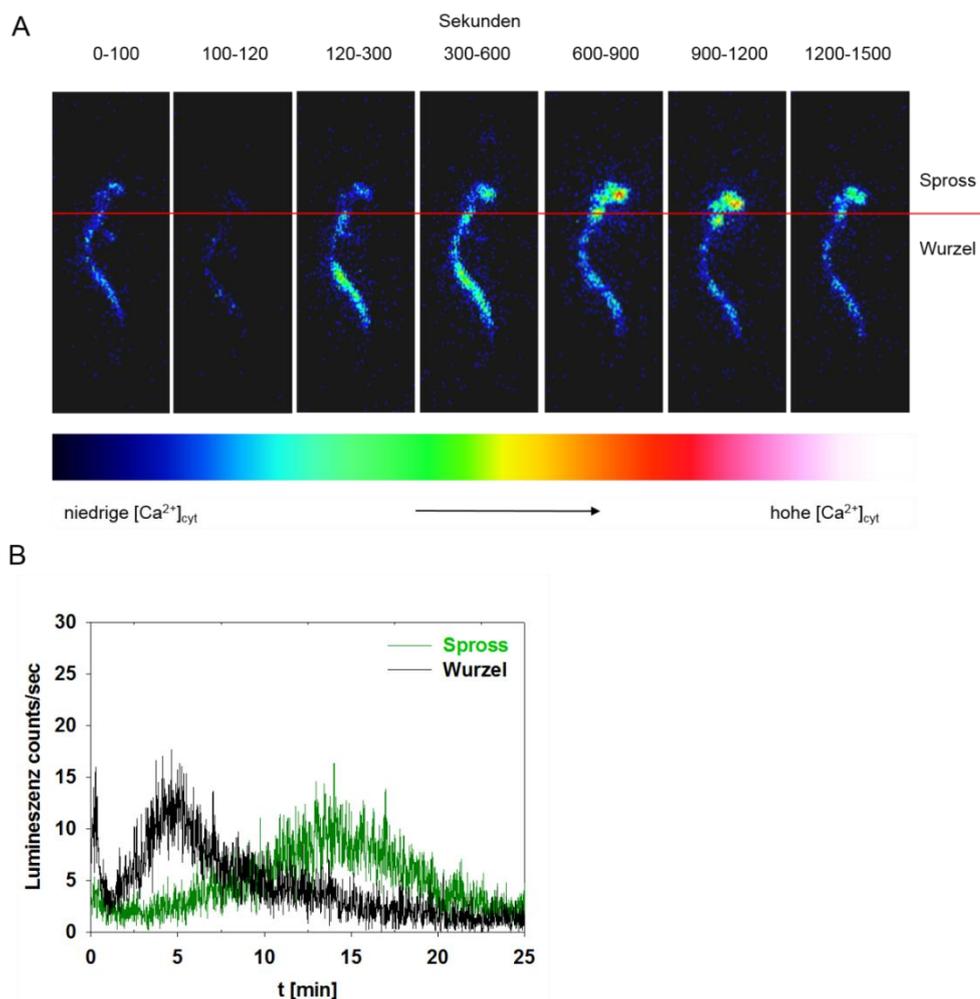


Abbildung 32: Aequorin-basierte Messung der $[Ca^{2+}]_{cyt}$ nach Sperminapplikation (1 mM) an 7 Tage alten Arabidopsiskeimlingen. Der komplette Keimling wurde mit Spermin behandelt. Die Messung der Aequorin-Lumineszenz erfolgte über einen Zeitraum von 25 Minuten mit einer Photonen-zählkamera. A) Falschfarbenbilder des behandelten Keimlings. B) Lumineszenz getrennt nach Spross und Wurzel. Das Experiment wurde dreimal mit vergleichbarem Ergebnis wiederholt.

In einem nächsten Schritt sollte ein möglicher Zusammenhang zwischen Wurzel- und Sprosssignal untersucht werden. Hierzu wurde die Pflanze zwei Stunden vor der Messung mittels Skalpell in Wurzel und Spross getrennt.

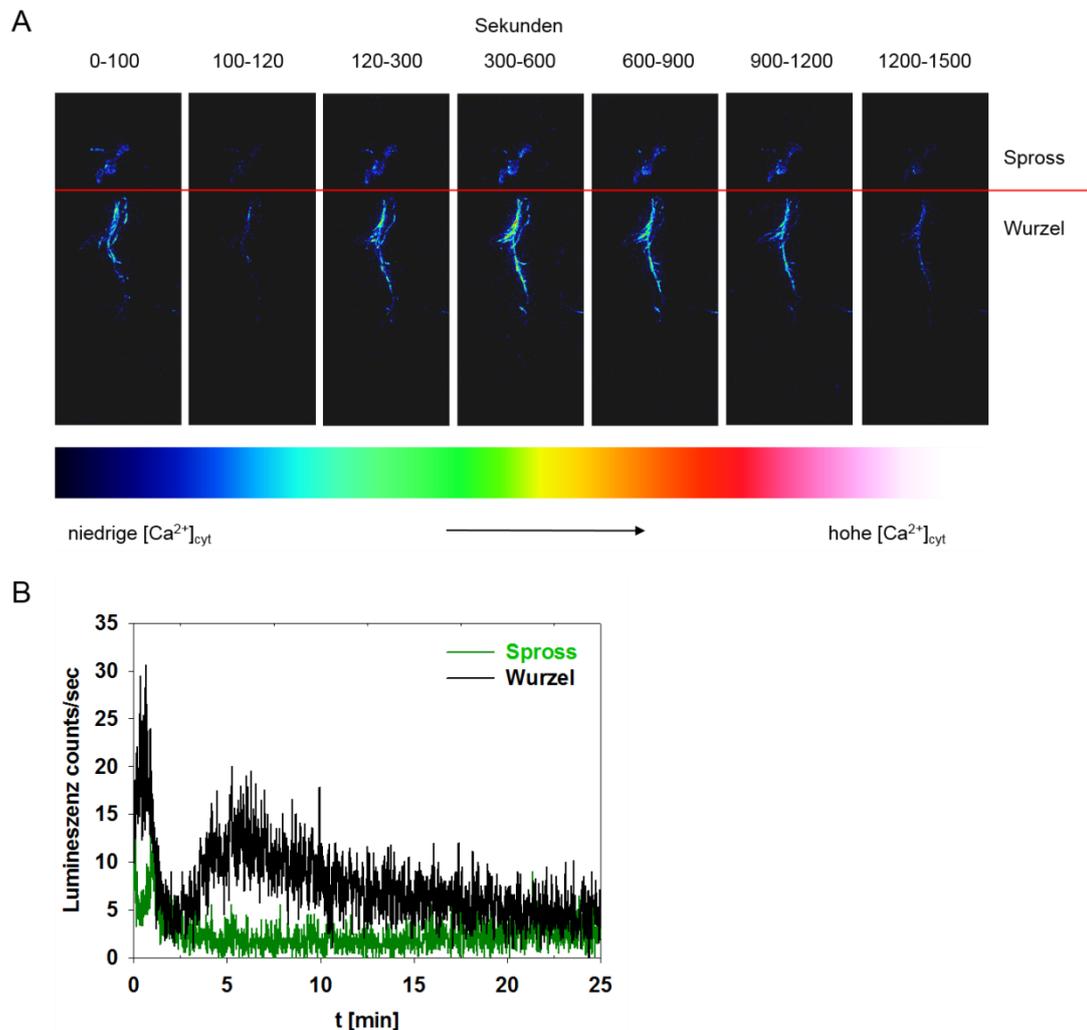


Abbildung 33: Aequorin-basierte Messung der $[Ca^{2+}]_{cyt}$ nach Sperminapplikation (1 mM) an 7 Tage alten, in Spross und Wurzel getrennten, Arabidopsiskeimlingen.

Die Messung der Aequorin-Lumineszenz erfolgte über einen Zeitraum von 25 Minuten mit einer Photonenzählkamera. Die Keimlinge wurden vor der Behandlung in Spross und Wurzel geteilt, anschließend mit Spermin behandelt und die Lumineszenz aufgezeichnet. A) Falschfarbenbilder des behandelten Keimlings, B) Lumineszenz von Spross und Wurzel. Das Experiment wurde dreimal mit vergleichbarem Ergebnis wiederholt.

Auch hier konnte ein sofortiger Anstieg der Lumineszenz in Wurzel und Spross unmittelbar nach Sperminapplikation gemessen werden (Abb. 33). Anschließend erfolgte ein zweiter Anstieg in der Wurzel. Dieser glich jenem von intakten Keimlingen (Abb. 32) und war nach zehn Minuten wieder nahe dem Ausgangsniveau. Im Gegensatz zu den Versuchen mit Ganzpflanzen war ein Anstieg der Lumineszenz im Spross nach 10-15 min aber nicht zu beobachten. Im Spross konnte lediglich der frühzeitige Anstieg innerhalb der ersten Minute nach Sperminzugabe beobachtet werden; nach einer Minute

fiel die $[Ca^{2+}]_{cyt}$ wieder auf das Ausgangsniveau zurück. Auch in kumulativen Falschfarbenbildern ist im Spross keine Veränderung der $[Ca^{2+}]_{cyt}$ nach der ersten sofortigen Reaktion auf die Sperminapplikation beobachtbar (Abb. 33a). Dies deutet auf ein durch Trennung von Spross und Wurzel unterbundenen Ca^{2+} -Signal hin.

3.2.4 Einfluss von Spermin auf zytosolische Calciumkonzentrationen von Schließzellen

Spermin bewirkte ein Schließen von Stomata (3.1.3). Daher stellte sich die Frage, ob Spermin spezifisch in Schließzellen zu einer Reaktion der $[Ca^{2+}]_{cyt}$ führt. Für Messungen der $[Ca^{2+}]_{cyt}$ auf zellulärer Ebene wurden transgene Pflanzen mit dem fluoreszierenden ratiometrischen Ca^{2+} -Reporter Yellow Cameleon (YC) 3.6 (Nagai et al. 2004) verwendet. Messungen an Schließzellen von Gerste stellten sich jedoch aufgrund einer sehr hohen Autofluoreszenz als nicht machbar heraus (Daten nicht gezeigt). Aus diesem Grund wurden diese Messungen an *Arabidopsis thaliana* durchgeführt. Einzelne Schließzellen zeigten innerhalb von fünf Minuten nach Applikation von 1 mM Spermin eine starke Reaktion der $[Ca^{2+}]_{cyt}$, die sich in einer Abnahme der ECFP-Fluoreszenz und einer Zunahme der EYFP-Fluoreszenz äußerte (Abb. 34a-c). Testreihen mit einer Versuchsdauer von 1,5 h nach Sperminapplikation zeigten, dass die Ca^{2+} -Veränderungen nicht länger als 15 Minuten anhielten (Daten nicht gezeigt).

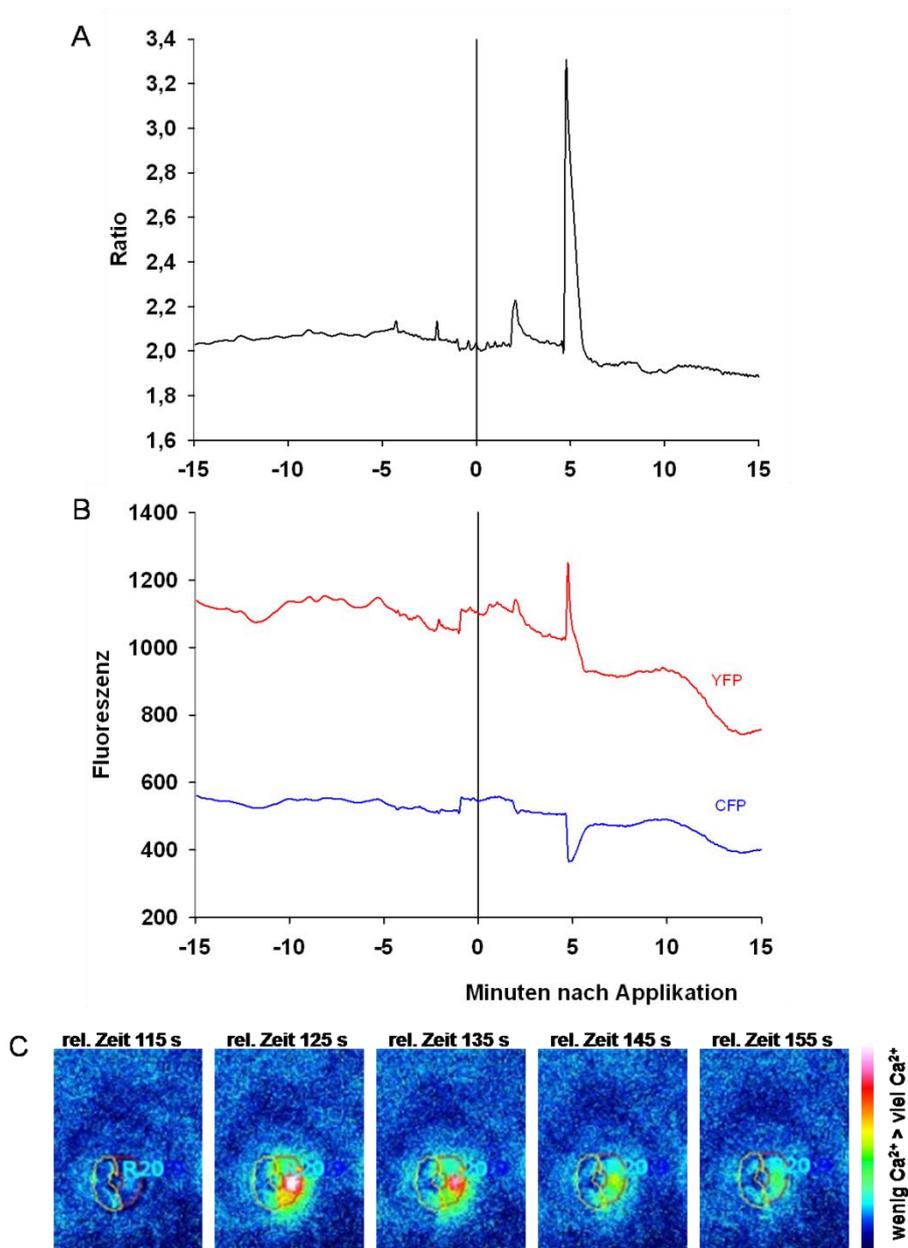


Abbildung 34: Ratiometrische Messung der $[Ca^{2+}]_{cyt}$ in Schließzellen 5 Wochen alter Arabidopsispflanzen nach Sperminapplikation (1 mM). A) Relative $[Ca^{2+}]_{cyt}$ (Verhältnis von YFP- und CFP-Fluoreszenz) einer mit Spermin behandelten Schließzelle, B) YFP- und CFP-Fluoreszenzintensität des Yellow Cameleon-Indikators der behandelten Zelle. Die Zelle wurde 10 min mit einem 20 s Messintervall untersucht, gefolgt von 5 min mit einem 5 s Intervall. Zum Zeitpunkt 0 erfolgte die Sperminapplikation. C) Falschfarbenbilder der relativen $[Ca^{2+}]_{cyt}$ der untersuchten Schließzelle.

Aufgrund der Schwankungen zwischen einzelnen Zellen und Versuchen (Daten nicht gezeigt) wurden zunächst einige Testreihen gemessen, um optimale Bedingungen zu ermitteln. Hierbei wurde die Auswirkung von unterschiedlichen Inkubationszeiten

analysiert. Wurden die Epidermisstreifen zwei Stunden vor der jeweiligen Messung präpariert, zeigten die einzelnen Zellen eine starke Neigung zu spontanen $[Ca^{2+}]_{cyt}$ -Oszillationen (Abb. 35a). Die Präparation am Tag vor der jeweiligen Messung mit einer Inkubation der Epidermisstreifen über Nacht in Inkubationspuffer führte bei der Mehrzahl der untersuchten Zellen zu stabileren Basislinien und ermöglichte eine klare Trennung von spontanen Veränderungen der $[Ca^{2+}]_{cyt}$ von denen, die durch die externe Applikation von Spermin induziert wurden (Abb. 35b). In beiden Varianten erfolgte eine Reaktion auf 1 mM Spermin unmittelbar nach der Zugabe. Alle weiteren Versuche wurden aufgrund der stabileren Messergebnisse mit Präparaten durchgeführt, die zuvor 24 h in Inkubationspuffer inkubiert wurden.

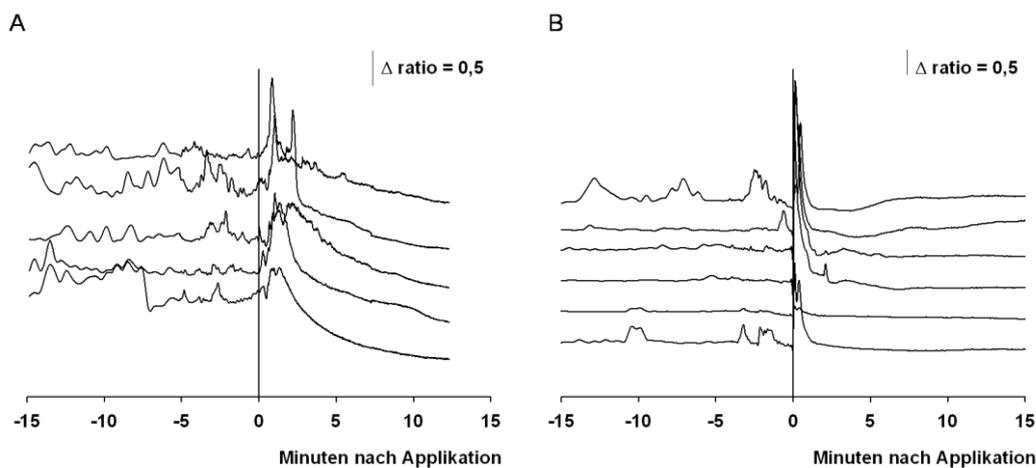


Abbildung 35: Ratiometrische Messung der $[Ca^{2+}]_{cyt}$ an Schließzellen 5 Wochen alter Arabidopsispflanzen nach Sperminapplikation (1 mM) (2 h Inkubationszeit oder Übernachtinkubation). Die Zellen wurden 10 min mit einem 20 s Messintervall untersucht, gefolgt von 5 min mit einem 5 s Messintervall. Zum Zeitpunkt 0 erfolgte die Sperminapplikation. A) Typische Messung der Spermin-induzierten $[Ca^{2+}]_{cyt}$ -Antwort an fünf Zellen eines Epidermisstreifens; jede Linie repräsentiert eine Zelle. Die Präparation des Epidermisstreifens erfolgte zwei Stunden vor der Messung. B) Typische Messung einer Spermin-induzierten $[Ca^{2+}]_{cyt}$ -Antwort an sechs Zellen eines Epidermisstreifens. Hier erfolgte eine Übernachtinkubation der präparierten Epidermisstreifen. Die Experimente wurden in drei biologischen Wiederholungen mit jeweils $n=15$ durchgeführt.

In weiteren Versuchen mit unterschiedlicher Sperminkonzentrationen von 10 μM bis 1 mM konnte gezeigt werden, dass die $[Ca^{2+}]_{cyt}$ -Antwort der Schließzellen konzentrationsabhängig ist. Je höher die Sperminkonzentration war, umso höher war sowohl die Anzahl der reagierenden Schließzellen, als auch die Amplitude der Reaktion. Während bei 10 μM Spermin nur anhaltend gering erhöhte $[Ca^{2+}]_{cyt}$ -Konzentrationen für

die Dauer von ein bis zwei Minuten beobachtet werden konnten, zeigten sich bei einer Behandlung mit 100 μM Spermin unmittelbar nach der Applikation deutliche Peaks (Abb. 36a,b). Diese Erhöhung konnte in rund 65% der behandelten Schließzellen detektiert werden. Bei einer Sperminapplikation in Höhe von 1 mM zeigte sich eine noch deutlichere schnelle Veränderung im $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$, wobei hier bei ca. 90% der analysierten Schließzellen eine Reaktion zu beobachten war (Abb. 36c).

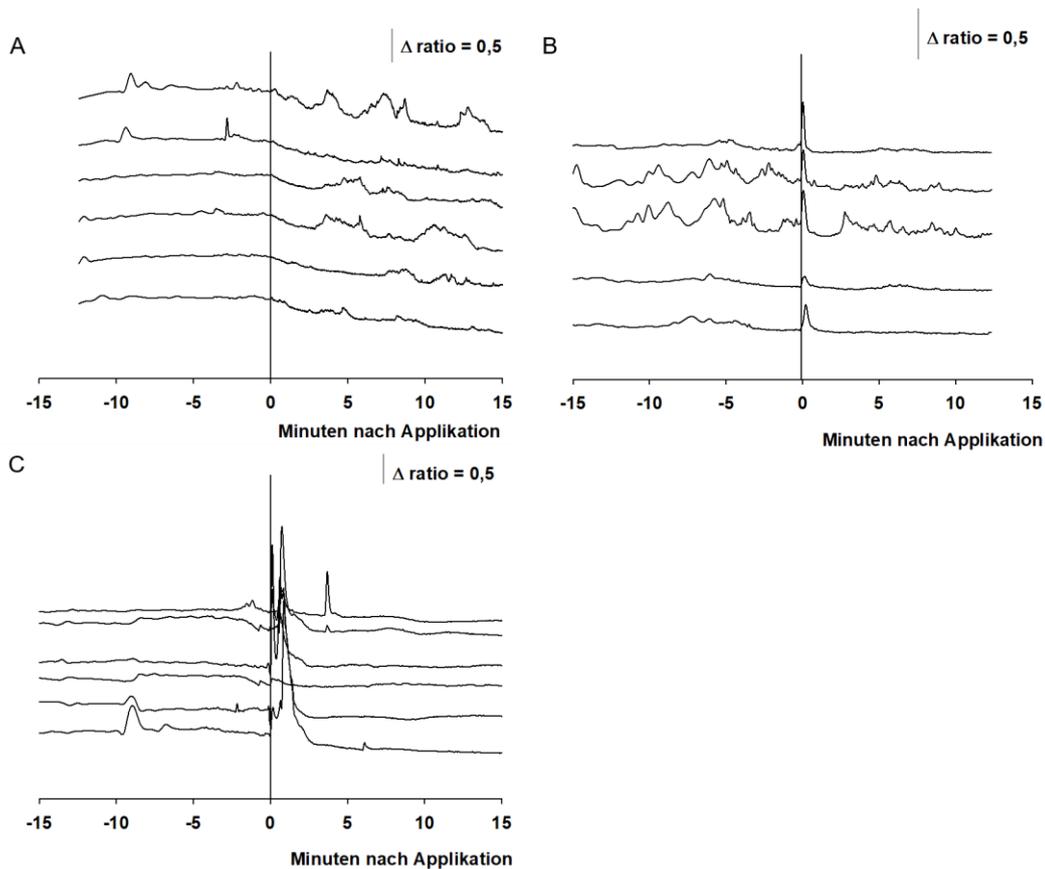


Abbildung 36: Ratiometrische Messung der $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ an Schließzellen 5 Wochen alter Arabidopsispflanzen nach Sperminapplikation. Die Schließzellen wurden 10 min mit einem 20 s Messintervall untersucht, gefolgt von 5 min mit einem 5 s Messintervall. Zum Zeitpunkt 0 erfolgte die Sperminapplikation in verschiedenen Konzentrationen. Jede Linie repräsentiert eine Schließzelle. $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ -Antwort auf A) 10 μM Spermin, B) 100 μM Spermin und C) 1 mM Spermin. Die Experimente wurden in drei biologischen Wiederholungen mit jeweils $n=15$ durchgeführt.

Um zu klären, ob die Ca^{2+} -Antwort auf externes Spermin direkt durch das Spermin ausgelöst wird oder ob H_2O_2 eine Rolle spielt, wurde Ascorbinsäure als Antioxidans eingesetzt, mit dessen Hilfe gebildetes H_2O_2 abgefangen werden sollte, wie zuvor bei Schließzellmessungen (Abb. 19). Epidermistreifen wurden 15 Minuten vor

Sperminapplikation in Ascorbinsäure-enthaltendem Puffer inkubiert. Eine Vorbehandlung mit 5 mM Ascorbinsäure beeinflusste die Spermin-induzierte $[Ca^{2+}]_{cyt}$ -Reaktion (Abb. 37a). Die Amplitude der Reaktionsspitzen lag dabei deutlich unter der von nicht mit Ascorbinsäure behandelten Zellen. Auch eine Vorinkubation mit 1 mM Ascorbinsäure verminderte die Höhe der Reaktionsspitzen, jedoch in geringerem Maße (Abb. 37b). Die Ergebnisse legen nahe, dass die Reaktion auf extern appliziertes Spermin ganz oder teilweise durch die Bildung von H_2O_2 ausgelöst wird.

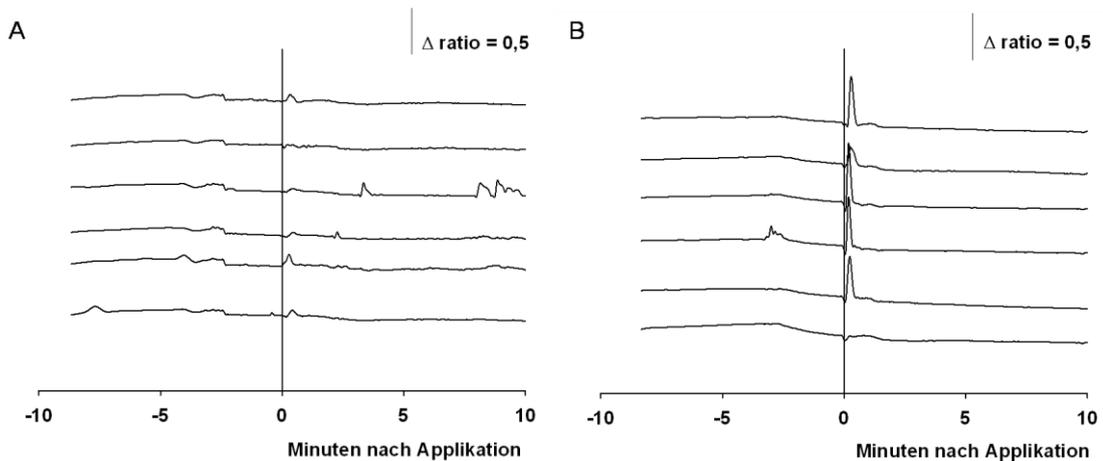


Abbildung 37: Ratiometrische Messung der $[Ca^{2+}]_{cyt}$ in Schließzellen 5 Wochen alter Arabidopsispflanzen nach Vorinkubation mit Ascorbinsäure und Sperminapplikation (1 mM). Die Zellen wurden 6 min mit einem 20 s Messintervall untersucht, gefolgt von 4 min mit einem 5 s Messintervall. Zum Zeitpunkt 0 erfolgte die Sperminapplikation (1 mM). Jede Linie repräsentiert eine Schließzelle. Epidermisstreifen wurden vor dem Versuch 15 min inkubiert in A) 5 mM Ascorbinsäure und B) 1 mM Ascorbinsäure. Die Experimente wurden in drei biologischen Wiederholungen mit $n=15$ durchgeführt.

Veränderungen der $[Ca^{2+}]_{cyt}$ können sowohl abhängig von der Ca^{2+} -Freisetzung aus intrazellulären Speichern als auch vom Ca^{2+} -Einstrom aus dem Apoplasten über die Plasmamembran sein. Durch die Nutzung des Ca^{2+} -Chelators EGTA sollte untersucht werden, inwieweit die durch Spermin induzierte Änderung der $[Ca^{2+}]_{cyt}$ in Schließzellen abhängig vom Ca^{2+} -Einstrom ist. Dazu wurden die vorbereiteten Epidermisstreifen 15 Minuten vor Beginn der Messung entweder mit 5 mM oder mit 1 mM EGTA inkubiert. Bei einer Inkubation der Epidermisstreifen mit 1 mM EGTA reagierten die untersuchten Zellen nur noch gering auf 1 mM Spermin (Abb. 38a). Lediglich in vier von sechs Zellen konnte eine sehr geringe Reaktion registriert werden. Die Reizantwort erfolgte innerhalb einer Minute nach Sperminzugabe und dauerte maximal 30 Sekunden. Bei einer Konzentration von 5 mM EGTA wurde keine direkte Reaktion auf Spermin verzeichnet

(Abb. 38b). Der Ca^{2+} -Chelator EGTA war somit in der Lage, das $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ -Signal auf Spermin in Schließzellen vollständig zu unterbinden, was auf eine essentielle Rolle des Ca^{2+} -Einstroms aus dem Apoplasten in der Bildung dieses Signals hinweist.

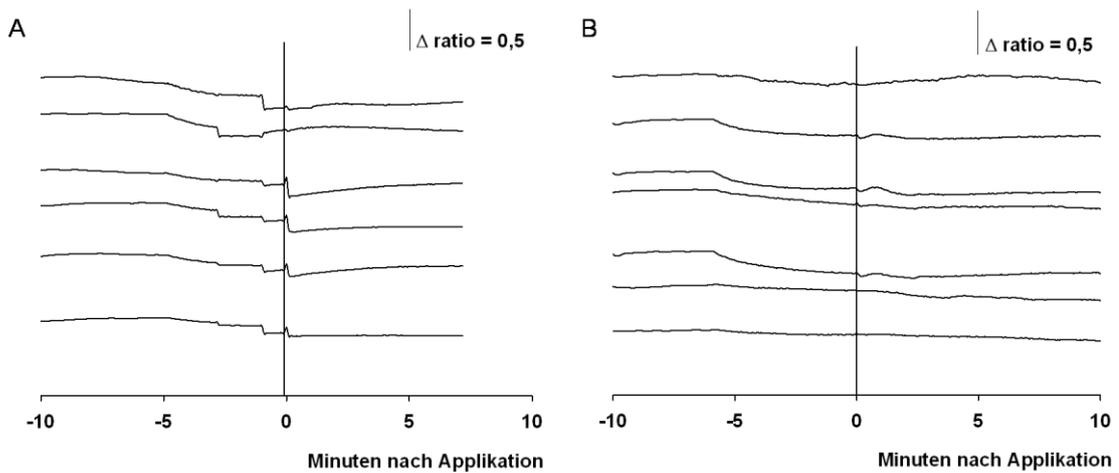


Abbildung 38: Ratiometrische Messung der $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ in Schließzellen 5 Wochen alter Arabidopsispflanzen nach Vorinkubation mit EGTA und Sperminapplikation (1 mM). Die Zellen wurden 6 min mit einem 20 s Messintervall untersucht, gefolgt von 4 min mit einem 5 s Messintervall. Zum Zeitpunkt 0 erfolgte die Sperminapplikation (1 mM). Jede Linie repräsentiert eine Schließzelle. A) Vorinkubation mit 1 mM EGTA, B) Vorinkubation mit 5 mM EGTA. Die Experimente wurden in drei biologischen Wiederholungen mit $n=15$ durchgeführt.

Die Zugabe von 1 mM EGTA zu Zellen, welche sich inmitten einer Reaktion auf 1 mM Spermin befanden, verkürzte die Dauer der $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ -Reaktion stark (Abb. 39a-b). Dauerte die Reizantwort ohne EGTA im Schnitt 90 Sekunden, war diese Zeit durch EGTA-Gabe um 60% auf zirka eine halbe Minute verkürzt. Dies zeigt, dass das Spermin-induzierte Ca^{2+} -Signal einen fortwährenden Ca^{2+} -Einstrom erfordert.

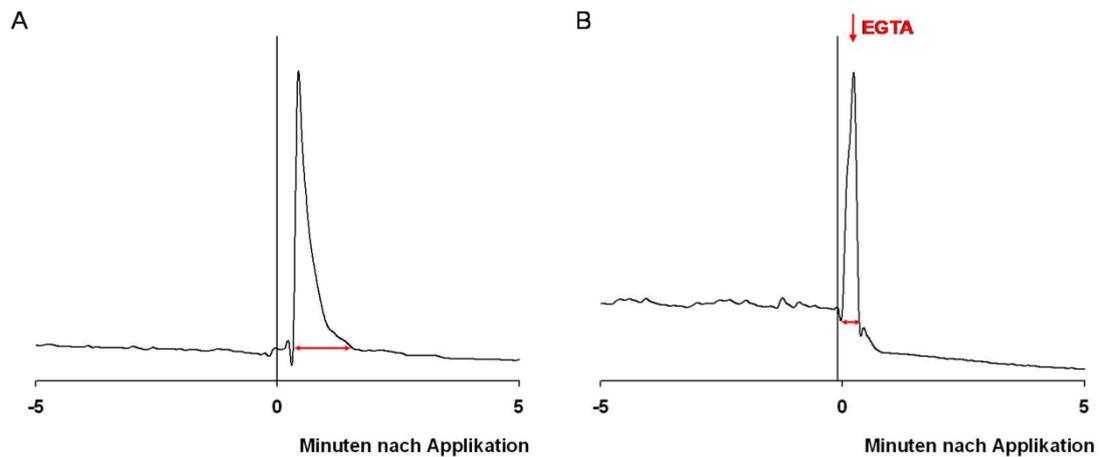


Abbildung 39: Ratiometrische Messung der $[Ca^{2+}]_{cyt}$ an Schließzellen 5 Wochen alter Arabidopsispflanzen nach Sperminapplikation und Zugabe von EGTA während der $[Ca^{2+}]_{cyt}$ -Antwort. Die Zellen wurden 10 min mit einem 20 s Messintervall untersucht, gefolgt von 5 min mit einem 5 s Messintervall. Zum Zeitpunkt 0 erfolgte die Sperminapplikation (1 mM). $[Ca^{2+}]_{cyt}$ Antwort auf A) 1 mM Spermin einer ausgesuchten Zelle eines Epidermisstreifens, B) Zugabe von 1 mM EGTA (Zeitpunkt markiert durch Pfeil) zu einer auf 1 mM Spermin reagierenden Zelle. Die Experimente wurden in drei biologischen Wiederholungen mit $n=9$ durchgeführt.

3.3 Identifizierung und Analyse von Sperminsynthasen in Gerste

3.3.1 Identifizierung zweier Sperminsynthasen und einer Spermidinsynthese in Gerste

In Kooperation mit Sebastian Pietack (Institut für Pharmazie, MLU Halle-Wittenberg) wurde eine Datenbanksuche (Auflistung siehe Kapitel 2.1) nach möglichen Sperminsynthasen in Gerste durchgeführt. Als Vorlagesequenzen dienten die Sperminsynthasesequenzen aus *Arabidopsis thaliana* (At), *Glycine max* (Gm), *Oryza sativa* (Os), *Triticum aestivum* (Ta) sowie *Zea mays* (Zm). Die Suche ergab mehrere unterschiedliche Genmodelle, die vermutlich für Aminopropyltransferasen kodieren. Unter diesen Sequenzen konnten durch Klonierung und heterologe Genexpression zwei Sperminsynthasen und eine Spermidinsynthese in Gerste identifiziert werden. Durch Enzymtests konnte deren Aktivität auch *in vitro* nachgewiesen werden (Pietack 2019).

Die höchste Sequenzübereinstimmung mit den bekannten Sperminsynthasen konnte für den cDNA-Klon FLbaf92k17 gefunden werden (BLAST). Diese Sequenz wurde aus Gerste-cDNA kloniert. Durch Sequenzierung konnten 1158 bp dieses Klons bestätigt

werden (*HvSPMS1*). Für putative Spermidinsynthesen wurde der cDNA-Klon flbaf61p21 mittels Datenbankrecherche gefunden. Anschließend wurde aus Gerstenpflanzen mRNA isoliert und mittels degenerierter Primer nach weiteren passenden Sequenzen für mögliche Spermin- oder Spermidinsynthesen in Gerste gesucht. Damit konnte noch eine weitere mögliche Sperminsynthese (*HvSPMS2*) mit einer Länge von ebenfalls 1158 bp gefunden werden. Eine mögliche Thermosperminsynthese konnte nicht gefunden werden. Der Vergleich der Proteinsequenzen von *HvSPMS1* und *HvSPMS2* (Abb. 40) zeigte die Übereinstimmungen der beiden Sperminsynthesen zueinander (78% Identität). Ein Vergleich der Proteinsequenzen der Sperminsynthesen mit der Spermidinsynthese zeigte eine Identität von lediglich 52%.

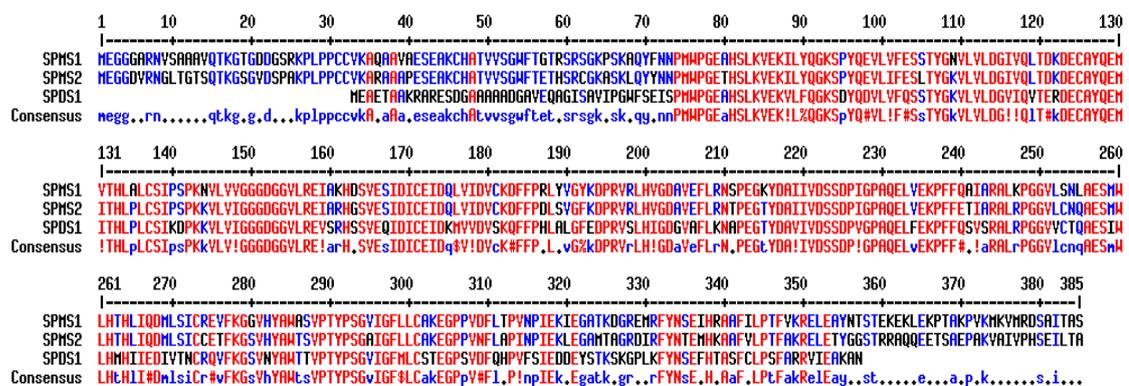


Abbildung 40: Vergleich der Proteinsequenzen der Sperminsynthesen *HvSPMS1* und *HvSPMS2* und der Spermidinsynthese *HvSPDS*. Analyse mit Hilfe des Programms Multalin. Rote Markierungen kennzeichnen gleiche oder funktional ähnliche Aminosäuren aller drei Proteine, blaue Markierungen stehen für gleiche oder ähnliche Aminosäuren von zwei Proteinen, schwarze Aminosäuren zeigen keine Übereinstimmung.

Mit Hilfe eines Vergleichs bekannter Spermin- und Spermidinsynthesen der Pflanzen *Arabidopsis thaliana* (At), *Glycine max* (Gm), *Oryza sativa* (Os), *Triticum aestivum* (Ta) sowie *Zea mays* (Zm) mit den aus Gerste identifizierten Proteinsequenzen konnten konservierte Aminosäuremotive, die in allen analysierten Sperminsynthesen vorliegen, nachgewiesen werden. Die gefundenen Aminosäuresequenzen in Gerste wurden mit bekannten Aminosäuresequenzen aus unterschiedlichen Pflanzen (Rodríguez-Kessler et al. 2010) verglichen, sodass für die gefundenen Spermin- und Spermidinsynthesen in Gerste ebenfalls spezifische Aminosäureveränderungen in *SPMS* sowie konservierte Aminosäuren, die zur Bildung der Put-Bindungsstelle in *SPDS* beitragen, markiert werden konnten (Abb. 41).

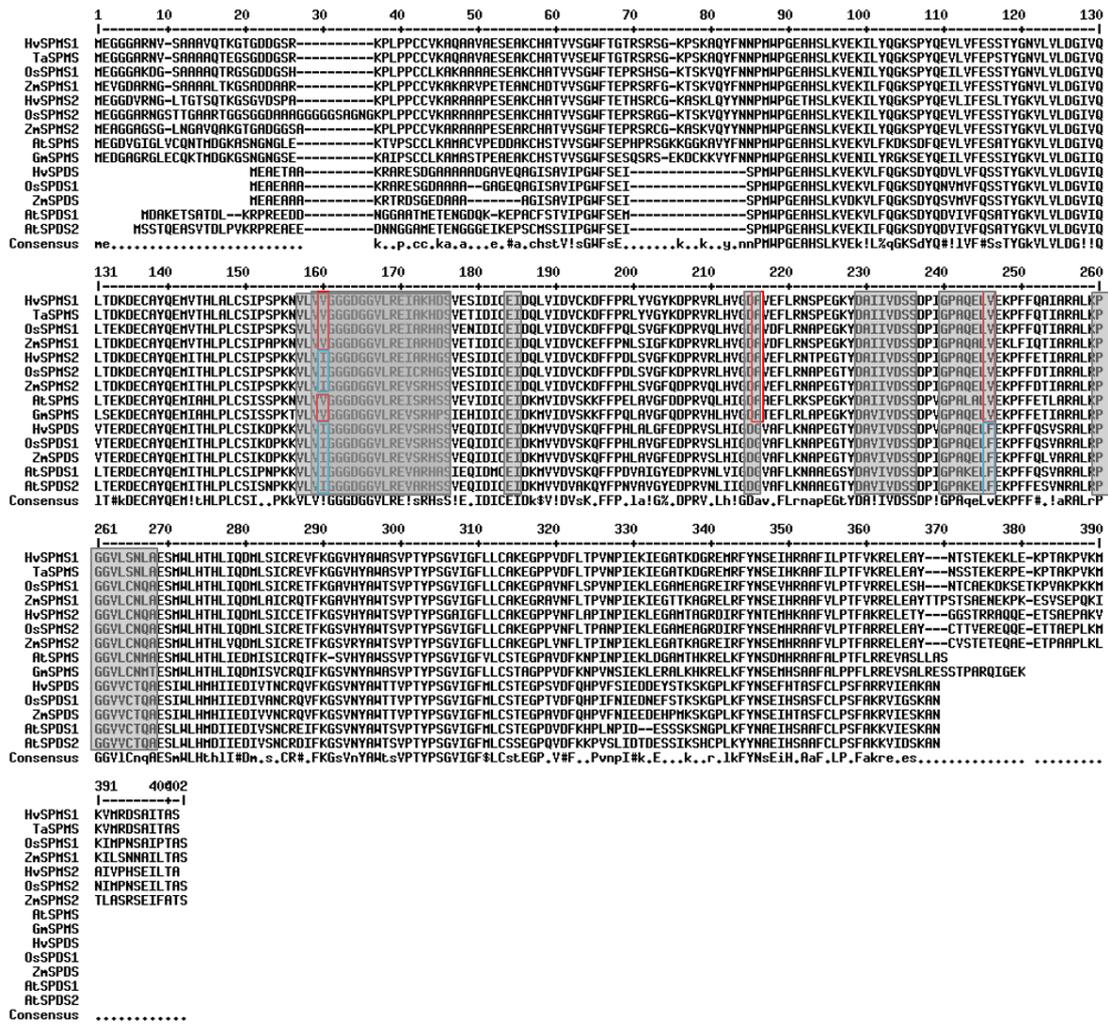


Abbildung 41: Sequenzvergleich von SPMS- und SPDS-Proteinen. Analyse mit Hilfe des Programms Multalin, Markierungen nach Rodriguez-Kessler et al. 2010. Substrat- und Co-Substrat-Bindungsstellen grau umrandet, Spezifische Aminosäureveränderungen in SPMS rot umrandet, eindeutige und konservierten Aminosäuren, die zur Bildung der Put-Bindungsstelle in SPDS beitragen, sind blau umrandet. *Arabidopsis thaliana* (At), *Glycine max* (Gm), *Hordeum vulgare* (Hv), *Oryza sativa* (Os), *Triticum aestivum* (Ta), *Zea mays* (Zm).

Um Homologien zwischen den einzelnen Aminopropyltransferasen darzustellen, wurde ein phylogenetischer Baum von Spermidin-, Spermin- und Thermosperminsynthasen mit Hilfe des Programms MEGA5 angefertigt (Abb. 42). Ein Vergleich der Sequenzen aus Gerste mit denen aus Reis, Weizen und Mais zeigt, dass die gefundenen Gerstensperminsynthasen (*HvSPMS1*, *HvSPMS2*) sich in die Gruppe der monokotylen Sperminsynthasen einordnen, während die gefundene Spermidinsynthase (*HvSPDS1*) der Gruppe der monokotylen Spermidinsynthasen zugeordnet werden kann.

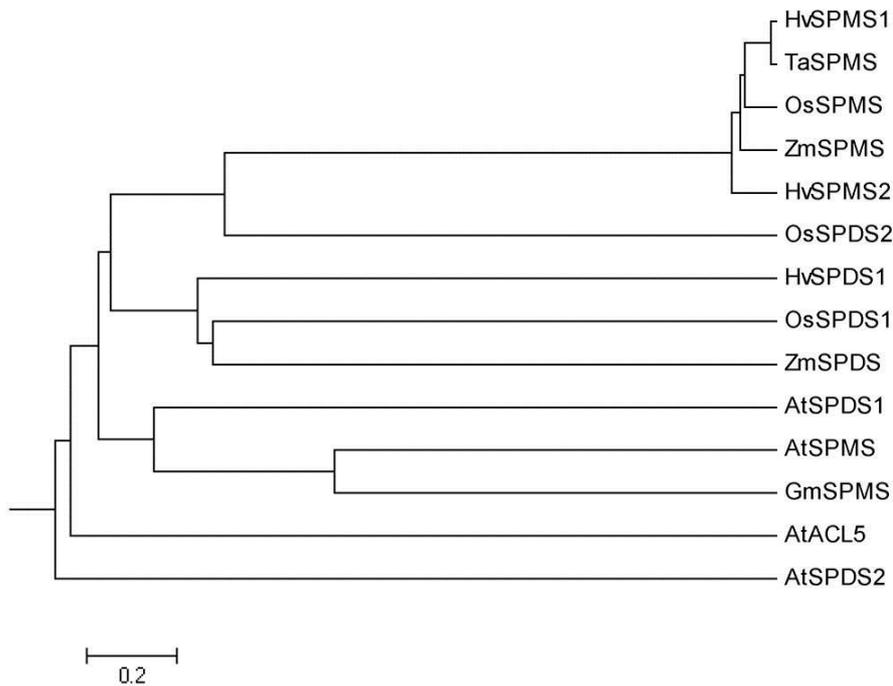


Abbildung 42: Phylogenetischer Baum von SPMS- und SPDS-Proteinen. Erstellt mit dem Programm MEGA5. *Arabidopsis thaliana* (At), *Glycine max* (Gm), *Hordeum vulgare* (Hv), *Oryza sativa* (Os), *Triticum aestivum* (Ta), *Zea mays* (Zm)

3.3.2 Expressionsanalysen der Spermidinsynthese- und Sperminsynthese-codierenden Gene in Gerste und *Arabidopsis thaliana*

3.3.2.1 Datenbankrecherchen

Um die Rolle von Spermin- und Spermidinsynthasen in der Pflanze zu untersuchen, wurde die Expression der Gene zu verschiedenen Entwicklungsstadien *in silico* analysiert. Für *Arabidopsis* wurde die Online-Datenbank Genevestigator (<https://www.genevestigator.com/gv/plant.jsp>) herangezogen. Die erhaltenen Daten zeigten, dass das Gen der Sperminsynthese, *AtSPMS*, in *Arabidopsis* in allen Entwicklungsstadien exprimiert wird und dass vor allem in der Seneszenz die Expression deutlich ansteigt (Abb. 43). Das Gen der Thermosperminsynthese, *AtACL5*, wird dagegen durchgehend auf niedrigem Niveau exprimiert. Die Gene beider Spermidinsynthasen, *AtSPDS1* und 2, zeigten Schwankungen in ihrer Expression.

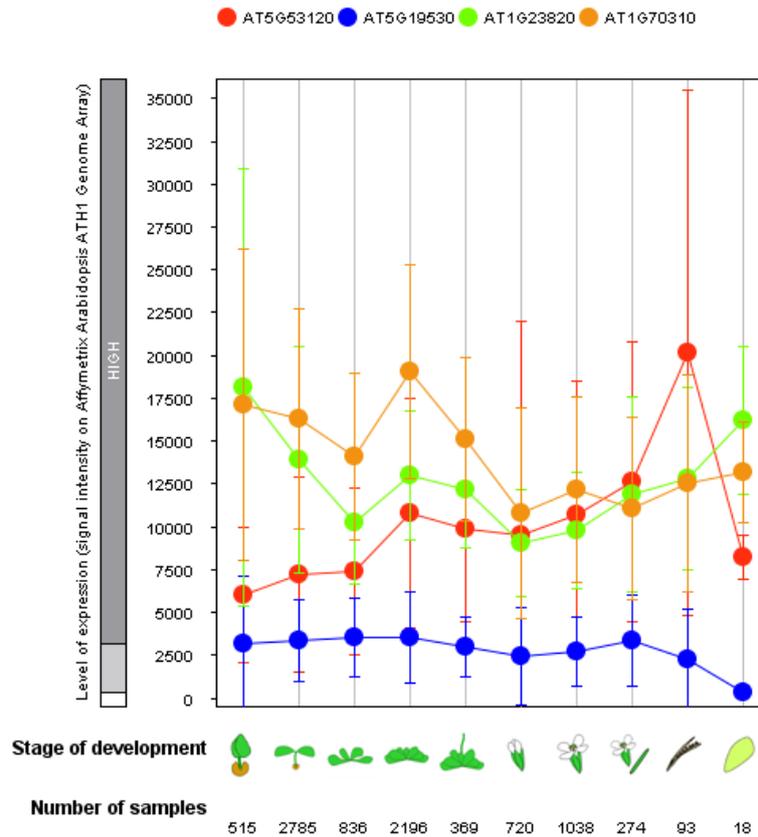


Abbildung 43: Expressionsmuster von Polyaminsynthase-codierenden Genen in unterschiedlichen Entwicklungsstadien von *Arabidopsis thaliana*. Grafik wurde mit der Genevestigator Datenbank erstellt. Dargestellt sind: *AtSPMS* (rot), *AtACL5* (blau), *AtSPDS1* (grün) und *AtSPDS2* (orange). Gezeigte Stadien von links: gekeimte Samen, Keimlinge, junge Rosette, reife Rosette, Schossen, junge Blüte, reife Blüte, Blüte mit Schoten, reife Schoten, Seneszenz der Pflanze.

Genevestigator wurde ebenfalls für die Analyse der Gene in Gerste verwendet (Abb. 44). Die Expressionsdaten für *HvSPMS1*, *HvSPMS2* und *HvSPDS* zeigten ebenfalls deutliche Schwankungen im Entwicklungszyklus der Pflanze. Während *HvSPDS* (rot) vor allem während der Keimung stark exprimiert wird, zeigte *HvSPMS1* (grün) einen tendenziellen Anstieg der Expression in den ersten Tagen nach der Keimung. Das Gen der zweiten putativen Sperminsynthase, *HvSPMS2* (blau), wird durchgehend auf einem niedrigeren Niveau exprimiert.

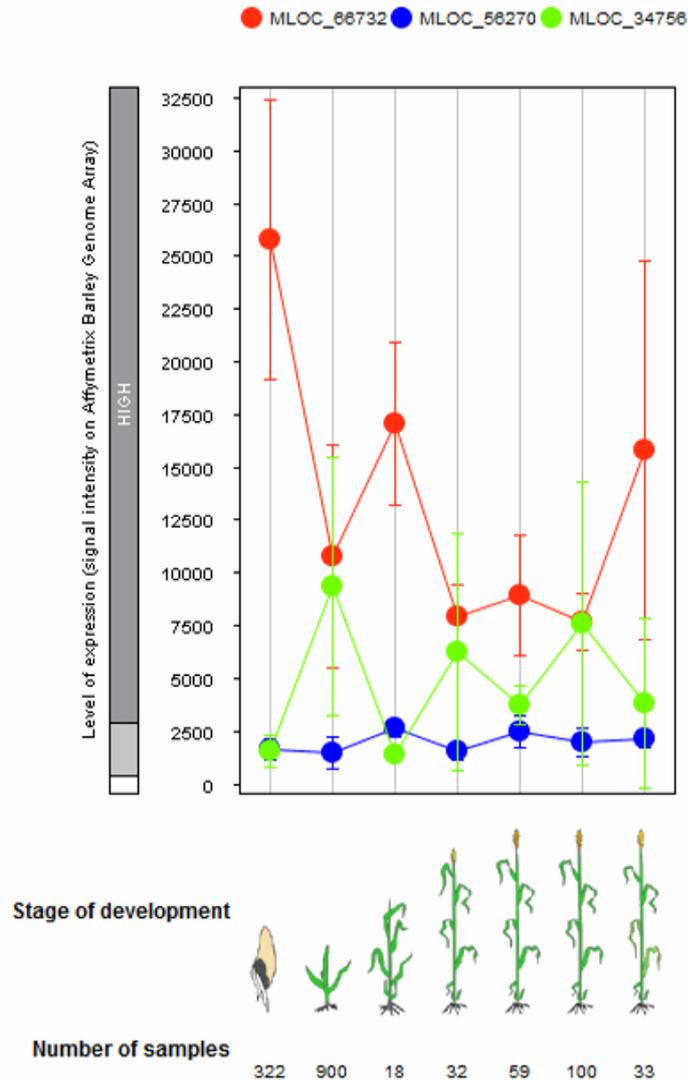


Abbildung 44: Expressionsmuster von Polyaminsynthese-codierenden Genen in unterschiedlichen Entwicklungsstadien der Gerste. Grafik wurde mit der Genevestigator-Datenbank erstellt. Dargestellt sind: *HvSPMS1* (grün), *HvSPMS2* (blau), *HvSPDS* (rot). Gezeigte Stadien von links: gekeimte Samen, Blatentwicklung, Bestockung, Schossen, Ährenschieben, Blüte, Fruchtbildung bis Reife.

3.3.2.2 Expression der Spermidinsynthese- und Sperminsynthese-codierenden Gene der Gerste über einen kompletten Entwicklungszyklus

Wurde das Expressionsmuster von *HvSPMS1*, *HvSPMS2* und *HvSPDS* mittels qRT-PCR über einen kompletten Entwicklungszyklus ermittelt, zeigten sich auch hier Schwankungen (Abb. 45). Während des 1-3 Blattstadiums (Tag 7) und während des Bestockens (Tag 21) war die Expression von *HvSPMS1*, *HvSPMS2* und *HvSPDS* gering. Im Anschluss erhöhte sich die Expression von *HvSPMS1* und *HvSPMS2* und blieb bei

HvSPMS2 konstant leicht erhöht, während *HvSPMS1* stärker schwankte. Auch bei *HvSPDS* kam es zu leichten Schwankungen während der Entwicklung. Wurden bis drei Tage nach der Keimung noch erhöhte Expressionsraten beobachtet, so sank die Expression während des Bestockens (Tag 21) und Schossens (Tag 35) auf niedrigste Werte. Zur Zeit des Ährenschiebens und der Blüte (Tag 49-63) sowie der Milchreife des Korns, lagen die Expressionswerte wieder höher und sanken, im Gegensatz zu *HvSPMS1* und 2, während der Seneszenz (Tag 119) wieder ab.

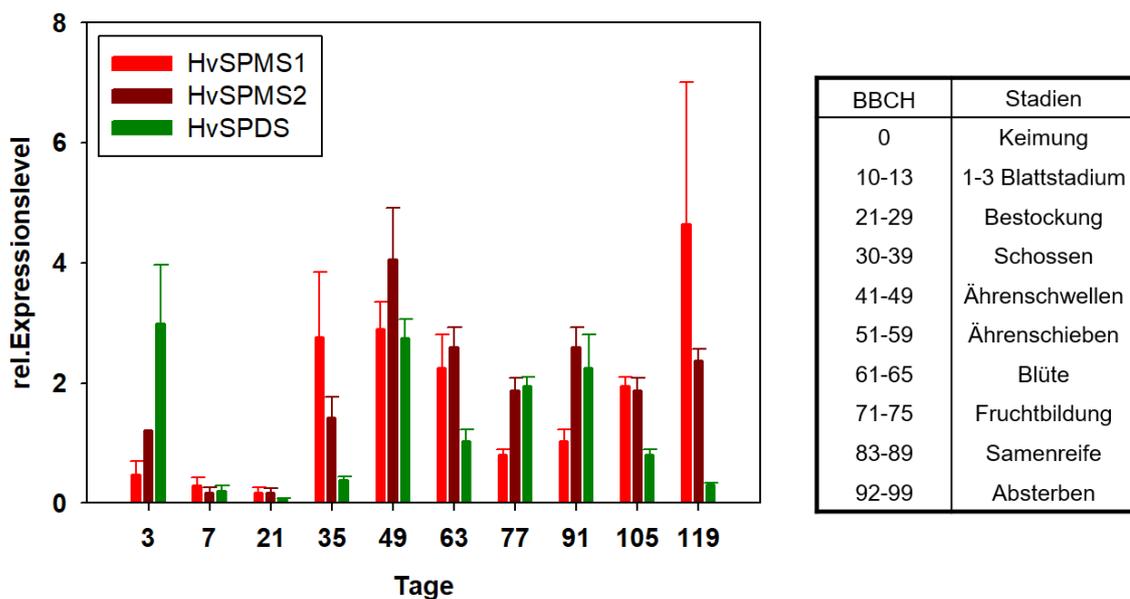


Abbildung 45: Relative Expression von *HvSPMS1*, *HvSPMS2* und *HvSPDS* in unterschiedlichen Entwicklungsstadien von Gerstenpflanzen (cv. Golden Promise). Messung erfolgte an Blatt- und Sprossmaterial mittels qRT-PCR über einen Entwicklungszyklus von 119 Tagen; als Referenzgen diente GAPDH. Daten zeigen Mittelwerte und Standardfehler aus 3 biologischen Wiederholungen. Die Tabelle der BBCH Stadien gibt eine Übersicht über die phänologischen Entwicklungsstadien der Gerste.

3.3.2.3 Expression der Spermidinsynthese- und Sperminsynthese-codierenden Gene der Gerste während Trockenstress

In Kooperation mit dem Institutsbereich Pflanzenphysiologie der Universität Halle-Wittenberg (Prof. Dr. Humbeck) wurde die Expression der Sperminsynthese- und Spermidinsynthese-codierenden Gene während Trockenstressbedingungen analysiert. Abbildung 46 zeigt die Ergebnisse der Expressionsanalysen unter verschiedenen Stressintensitäten. Die quantitativen qRT-PCR-Werte wurden normalisiert zum Referenzgen *Actin*, relativ zur ungestressten Kontrolle. Es konnte beobachtet werden,

dass in einer frühen Phase des Stresses (T1) mit Bodenwassergehalten von 40% keine Unterschiede in der Expression von *HvSPMS1*, *HvSPMS2* und *HvSPDS* zu beobachten waren. Ab einem Wassergehalt des Bodens von 20% konnte ein signifikanter Anstieg der relativen Expression von *HvSPMS1* gemessen werden. In einer späten Phase des Trockenstresses mit Bodenwassergehalten von 10% stieg insbesondere die relative Expression von *HvSPMS1*, aber auch die von *HvSPMS2*. In allen Phasen des Trockenstresses wurde keine Veränderung der Expression der *HvSPDS* festgestellt. Dies deutet auf eine primäre Rolle der Sperminsynthasen der Gerste während Trockenstress.

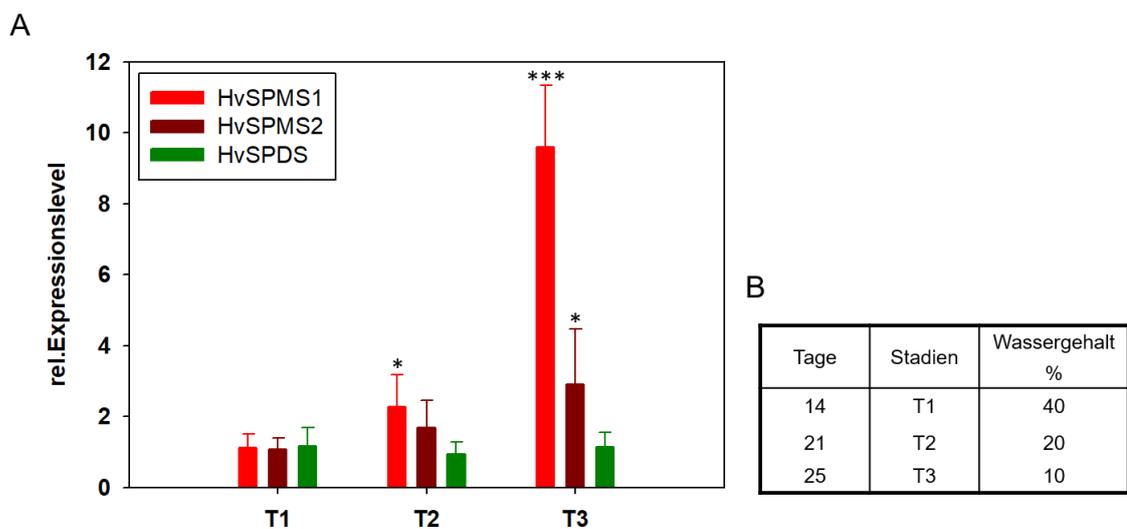


Abbildung 46: Expression von *HvSPMS1*, *HvSPMS2* und *HvSPDS* während Trockenstress in Gerste (cv. Golden Promise) relativ zur ungestressten Kontrolle.

Messung erfolgte an Blattmaterial mittels qRT-PCR, als Referenzgen diente *Actin*. B) Wassergehalte des Bodens in den Trockenstresstadien T1-T3. Daten sind Mittelwerte und Standardfehler aus drei unabhängigen Experimenten mit jeweils $n = 5$. Verglichen wurden jeweils die einzelnen Behandlungen mit der Kontrolle; signifikante Unterschiede sind gekennzeichnet mit * = $P < 0.05$, ** = $P < 0.01$, *** = $P < 0.001$.

3.3.3 Erstellung von *SPMS*-Überexpressoren und Herunterregulierung der *SPMS*-Expression in Gerstenpflanzen – Ergebnisse der Transformation

Die Ergebnisse dieser Arbeit legen die Annahme nahe, dass Spermin als Regulator von Schließzellen fungiert und Sperminsynthasen damit eine Rolle während Trockenstress in Gerste spielen. Diese Annahme wurde durch die erhöhte Expression bei Trockenstress gestützt. In einem Folgeprojekt sollte daher anhand transgener

Gerstepflanzen der Effekt einer Erhöhung und einer Reduzierung der Expression der *HvSPMS*-Gene untersucht werden. Zur Erstellung dieser Linien wurden zum einen zwei RNAi-Konstrukte zum Knockdown und zum anderen zwei Konstrukte zur Überexpression der Gene kloniert. Mittels *Agrobacterium tumefaciens*-vermittelter Transformation wurden Embryos unreifer Körner mit diesen Konstrukten transformiert. Über einen Gewebekulturschritt wurden transgene Pflanzen regeneriert. Insgesamt konnten 34 Pflanzen mit dem *HvSPMS1*-Überexpressionskonstrukt und 52 Pflanzen mit dem *HvSPMS2*-Überexpressionskonstrukt stabil transformiert werden. Bei den RNAi-Konstrukten wurden für das erste Konstrukt 36 und für das zweite Konstrukt 50 Pflanzen erhalten. Wurden für die Überexpressoren 80 und 110 Scutelli mit Agrobakterien transformiert, so mussten für die Suppression 400 und 470 Scutelli transformiert werden. Die Transformationseffizienz lag somit in den Knock-down Linien deutlich unter denen der Überexpressoren (vgl. Tabelle 1).

Tabelle 1: Effizienz der Transformation von Gerste für *HvSPMS1*- und *HvSPMS2*-Überexpressoren und RNAi-Knock-down-Linien. Anzahl transformierter Scutelli und erzeugter Pflanzen, und die sich daraus ergebene Effizienz der Transformation mit den unterschiedlichen Konstrukten.

Konstrukt	Scutelli	Pflanzen	Effizienz bzgl. Pflanzen
Überexpression <i>SPMS1</i>	80	34	42%
Überexpression <i>SPMS2</i>	110	52	47%
RNAi Knockdown <i>SPMS1</i> und <i>SPMS2</i> (R1)	470	36	8%
RNAi Knockdown <i>SPMS1</i> und <i>SPMS2</i> (R2)	400	50	13%

Eine Behandlung der transgenen Pflanzen mit dem Herbizid Basta ermöglichte die Identifikation der transgenen Gerstepflanzen (Abb. 47c). Weitergehende Untersuchungen hinsichtlich der Homozygotie, der Expression der *HvSPMS*-Gene und der Polyamingehalte wurden in einem sich anschließenden Projekt durchgeführt. In diesem sollte anhand der transgenen Pflanzen auch der mögliche Einfluss der Spermiosynthesen während Trockenstressphasen analysiert werden.

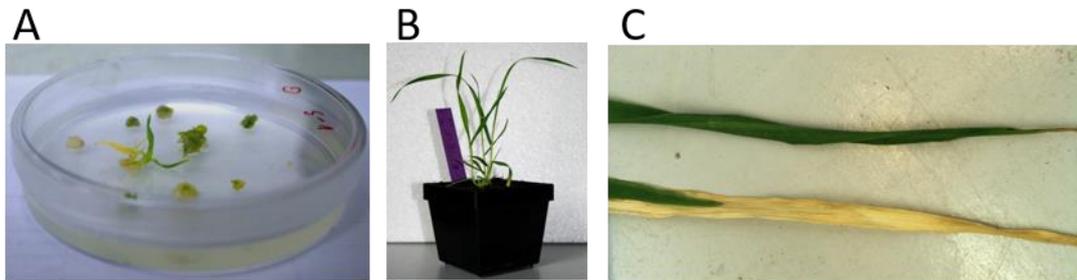


Abbildung 47: Regeneration und Selektion von transgenen Gerstenpflanzen. A) Sich aus Kallus entwickelnde Pflanze auf Sprossmedium in Petrischale. B) Transgene Pflanze (*HvSPMS1* Überexpressor) in Erde. C) Selektion von transgenen Pflanzen mittels Basta-Resistenz. Oberes grünes Blatt transgen, unteres weißes Blatt von nicht transformierter Wildtyp-Gerste.

4 Diskussion

4.1 Trägt das Polyamin Spermin zur Trocken- und Salzstresstoleranz von Gerste bei?

Ein Ziel dieser Arbeit war es, die Rolle des Polyamins Spermin in der Trocken- und Salzstresstoleranz in Gerste zu untersuchen. Um abiotischem Stress, wie Trockenheit, hohen Temperaturen, Verletzung, Versalzung oder Schwermetallvergiftung zu begegnen, haben Pflanzen eine Vielzahl von Möglichkeiten entwickelt, eine gewisse Toleranz gegenüber den Stressoren aufzubauen. Trockenstress durch Wassermangel äußert sich in einer Verringerung des Blattwasserpotentials und des Turgordruckes ebenso wie einem Schließen der Stomata. Zudem führt Trockenstress langfristig zu verringertem Zellwachstum und einer reduzierten Biomasse. Hierbei spielen Reaktionen innerhalb der Pflanze eine wichtige Rolle, welche die Photosyntheserate, den Chlorophyllgehalt, die Ionenaufnahme und die Assimilatverteilung beeinflussen. Trockenstress in Pflanzen führt zudem zur Anreicherung von ROS und damit zu oxidativen Schäden auf zellulärer Ebene, woraus eine Inaktivierung von Enzymen, Proteinabbau und Ungleichgewicht im Ionenhaushalt resultieren können (Hussain et al. 2018). Durch Stress kommt es in Pflanzen zudem zur Bildung und Anhäufung von Proteinen mit fehlerhafter Faltung im endoplasmatischen Retikulum. Für Spermin konnte in *Arabidopsis* gezeigt werden, dass es die Antwort auf diese fehlerhafte Proteinbildung induziert (Sagor et al. 2015).

Salzstress führt zu sofortigen, durch den osmotischen Stress bedingten, Schäden wie zum Beispiel Wachstumseinbußen, während der ionische Stress zu langfristigen Schäden führt. Diese resultieren aus einer vermehrten Anreicherung von Natrium- und Chloridionen (Munns et al. 2008). Toleranz gegen Stressoren bedeutet, dass die pflanzlichen Funktionen auch auf Kosten zum Beispiel des Wachstums aufrechterhalten werden. Polyamine scheinen hierbei eine entscheidende Rolle zu spielen. Dies zeigt sich in der Veränderung der Genexpression einzelner Polyaminsynthasen (Rangan et al. 2014) oder anderer Enzyme der Polyaminbiosynthese wie *SAM*, *SAMDC*, *ODC* oder *ADC*. *Cucumis sativus* Mutanten mit einer erhöhten *SAMDC*-Expression oder einer herunterregulierten *ADC*- und *ODC*-Expression zeigten während Salzstress gesteigerte Spermidin- und Sperminkonzentrationen sowie verringerte Putrescinkonzentrationen. In Keimlingen konnte so die Hemmung des Pflanzenwachstums unter Salzstress gemildert werden (Li et al. 2011, Takahashi et al. 2017b). Auch für *Arabidopsis* wurde gezeigt, dass Spermin essentiell für die Toleranz gegenüber Trocken- und Salzstress ist.

ACL5/SPMS Mutanten zeigten eine Hypersensitivität gegen hohe Salzgehalte und Trockenheit (Yamaguchi et al. 2007). Dieser Phänotyp konnte durch die exogene Applikation von Spermin behoben werden; Putrescin oder Spermidin hatten hingegen keinen Einfluss. Um einen möglichen positiven Einfluss endogener beziehungsweise exogener Erhöhung von Spermin auf Trocken- und Salzstress in Gerste nachzuweisen, wurden in dieser Arbeit Gerstepflanzen in Hydrokultur osmotischem Stress und Salzstress ausgesetzt; in Erdkultur wurde Trockenstress appliziert.

Während Trockenstress in Erdkultur konnte in Gerstepflanzen für die in dieser Arbeit gefundenen beiden Sperminsynthase-Gene (*HvSPMS1* und *2*) eine gesteigerte Expression gezeigt werden. Auch für *SPMS*-Gene in Arabidopsis und Reis konnte bereits eine trockenstressinduzierte Expression gezeigt werden (Hanzawa et al. 2002, Do et al. 2013). Damit geht unter anderem eine erhöhte Konzentration internen Spermins einher. Dies kann vor Zellschäden durch oxidativen Stress schützen. Die durch Spermin induzierte Toleranz gegen oxidativen Stress kann sowohl durch die Aktivierung eines enzymatischen und als auch auf nicht-enzymatischen Weg geschehen (Seifi et al. 2019). Eine Möglichkeit, in den enzymatischen Weg einzugreifen, besteht in der Beeinflussung der Aktivität der Superoxiddismutase (SOD) durch Spermin (Todorova et al. 2016, Nahar et al. 2016, Fu et al. 2014). Die Superoxiddismutase sorgt dafür, dass die durch Stress entstehenden reaktiven Sauerstoffspezies umgebaut werden und so kein schädigender oxidativer Stress in der Zelle entsteht. Hierfür katalysiert sie die Disproportionierung des Superoxidanion-Radikals zu H_2O_2 und O_2 . Durch die Spermin induzierte veränderte Aktivität von SOD kommt es zum Beispiel in Keimlingen der Mungbohne zu einer gesteigerten Toleranz gegenüber hohen Temperaturen und Trockenstress (Seifi et al. 2019). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass eine Sperminapplikation mit einer veränderten Aktivität von CAT, Glutathion S-Transferase und Glutathion Reduktase einhergeht. Auf nicht-enzymatischen Weg reguliert Spermin die Homöostase von Ascorbinsäure und Glutathion und reduziert somit eine Akkumulation von Trockenstress-induzierten ROS (Ha et al. 1998).

In einen weiteren Ansatz dieser Arbeit wurden in Hydrokultur kultivierten Gerstepflanzen osmotischem Stress ausgesetzt. Hierbei sollte die Wirkung einer externen Applikation von Spermin auf die Stresstoleranz untersucht werden. Um Trockenstress in Hydrokulturversuchen zu simulieren, ist die Wahl eines geeigneten Mediums und Osmotikums von großer Bedeutung. PEG 6000, welches im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurde, ist eine Substanz mit großem Anwendungsbereich. An vielen verschiedenen Pflanzen wie Arabidopsis, Mais, Reis und Gerste wurden bereits Versuche mit PEG 6000 als Simulator für Trockenstress vorgenommen (Wu und Cosgrove 2000; Biswas et al. 2002; Szira et al. 2008; Bengough et al. 2011; Habte et al.

2014). Aufgrund seines hohen Molekulargewichtes wird PEG nicht von der Pflanzenzelle aufgenommen und beeinflusst somit nicht den Metabolismus der Pflanze.

Nach Munns (1993) ist das Wachstum von unter Stress stehenden sich entwickelnden Blättern ein sehr sensibler Indikator, um den Einfluss von Stress auf die Pflanze zu messen. Durch Trockenstress kommt es zu einem verminderten Ertrag durch eine reduzierte Assimilationsrate und die Reduktion der produktiven Blattfläche. Des Weiteren beeinflusst auch die Verteilung des assimilierten Kohlenstoffs in photosynthetisch nicht aktive Pflanzenteile die Ertragsbildung (Chaves et al. 2002). In der vorliegenden Arbeit konnte in dem 14-tägigen Versuch kein Unterschied im Zuwachs der Sprosse zwischen Kontrollpflanzen und gestressten Pflanzen beobachtet werden. In allen Varianten mit durch PEG-induziertem osmotischem Stress konnte aber eine reduzierte Sprosstrockenmasse beobachtet werden. Die Diskrepanz zwischen gleichbleibenden Sprosszuwachs und reduzierter Trockenmasse könnte damit erklärt werden, dass es während des Versuches zu einer gelblichen Verfärbung der Blätter von PEG-behandelten Pflanzen kam. Dieses erste sichtbare Zeichen der Seneszenz, der oxidativen Degradierung von Chlorophyll durch Akkumulation von ROS in seneszenten Blättern, ist auch gekoppelt mit einer Reduzierung der Photosyntheserate, Verlust von Antioxidantien und einer Veränderung in der Zellstruktur was wiederum zu einer Gewichtsreduktion bei zunächst gleichbleibender Größe der Blätter führt (Munné-Bosch et al. 2004). Das Wurzelwachstum und die Wurzeltrockenmasse wurden jedoch beide durch den osmotischen Stress beeinflusst und zeigten gegenüber den Kontrollpflanzen verminderte Werte. So konnte trotz ausbleibenden Unterschieden im Sprosszuwachs bei PEG-behandelten Pflanzen im Vergleich zur Kontrolle angenommen werden, dass eine Stressreaktion der Gerste auf moderaten osmotischen Stress stattgefunden hat. Ein steigendes Verhältnis von Wurzel zu Spross als Zeichen der Stressvermeidung konnte bereits unter anderem für Weizen und Reis unter Trockenstress gezeigt werden (Magrin et al. 1991; Xu et al. 2015). In den Versuchen der vorliegenden Arbeit konnte jedoch kein gesteigertes Wurzel/Spross-Verhältnis der gestressten Gerstepflanzen beobachtet werden.

Auch die Behandlung der Gerstenpflanzen mit NaCl führte im Spross zu keinem unterschiedlichen Wachstum zwischen den mit Salz gestressten und den Kontrollpflanzen. Das Wurzelwachstum und die Trockenmassen der Wurzeln zeigten wiederum verminderte Werte in Reaktion auf den Stress. Um die Möglichkeit zur Wasseraufnahme aus tieferen Bodenschichten aufrecht zu erhalten, kann die Durchwurzungstiefe bei gestressten Pflanzen höher sein als bei optimal mit Wasser versorgten Pflanzen (Sharp und Davies 1985). Dieser Effekt ist in Hydrokultur so nicht nachweisbar, da die Wasserverfügbarkeit nicht eingeschränkt ist. Neben dem

osmotischen Stress kommt es durch den Salzstress auch zu toxisch hohen Natriumkonzentrationen im Zytosol. 2007 zeigten Zhao und Kollegen, dass die externe Applikation von Polyaminen den einwärts gerichteten Strom von K^+ und vor allem von Na^+ in Zellen der Wurzel von Gerstenpflanzen inhibiert. So konnte durch exogenes Spermidin die Na^+ -Konzentration der Wurzel und des Sprosses signifikant verringert werden. Die Aufnahme der Natriumionen aus dem Wurzelraum in die Pflanzenzelle erfolgt über verschiedene Transporter und Ionenkanäle (Deinlein et al. 2014). Als Reaktion darauf kommt es in der Pflanze zur verstärkten Genexpression z.B. des in der Plasmamembran lokalisierten Na^+/H^+ Antiporters *SOS1*. Dies führt zum Export von Natrium in den Apoplasten. Weiterhin kann die Kompartimentierung des Natriums in der Vakuole erfolgen. Hierfür werden verstärkt die Gene für Tonoplasten-lokalisierte Transporter (z.B. *NHX1* und *NHX2*) exprimiert (Apse et al. 1999, Shi et al. 2000). Auch Polyamine spielen bei der Kontrolle des Kationentransports eine Rolle. So reduziert zum Beispiel Putrescin die Akkumulation von Natrium- und Chloridionen in verschiedenen Organen von *Atropa belladonna* (Ali 2000). Dies ist wahrscheinlich auf die Beeinflussung sowohl vakuolärer und Plasmamembran-lokalisierter H^+ -Pumpen als auch von Ca^{2+} -Pumpen in der Plasmamembran zurückzuführen (Pottosin et al. 2014).

Dass Polyamine sowohl SV- (*TPC1*-) als auch FV-Kanäle der Vakuole blockieren können, konnte bereits gezeigt werden (Brüggemann et al. 1998, Dobrovinskaya et al. 1999). Die Blockierung der SV-Kanäle erfolgt spannungsabhängig. Den größten Effekt hat Spermin, gefolgt von Spermidin und Putrescin. SV-Kanäle werden durch die Zunahme des $[Ca^{2+}]_{cyt}$ aktiviert, mit einer geringeren Affinität auch durch Mg^{2+} . Gleichzeitig werden FV-Kanäle durch $[Ca^{2+}]_{cyt}$ und Mg^{2+} inhibiert. Spermin reguliert auch vakuoläre Ca^{2+}/H^+ -Austauscher (*CAX*) (Pottosin et al. 2014). So konnte in Arabidopsis-Doppelmutanten (*acl5/SPMS*) eine Hochregulierung von *CAX*-Genen beobachtet werden. Die Erhöhung der $[Ca^{2+}]_{cyt}$ führt schließlich zum Schutz vor dem Einstrom von Na^+ und K^+ in das Zytoplasma. Des Weiteren aktiviert sie den Na^+/K^+ -Einstrom in die Vakuole und die dortigen Kompartimentierung sowie die Unterdrückung des Ausstroms von Na^+/K^+ aus der Vakuole (Yamaguchi et al. 2006; Kusano et al. 2007a, b). Somit können Polyamine als Regulatoren für die zelluläre Kationenhomöostase agieren.

In den Trockenstressversuchen an Gerste in dieser Arbeit konnte in Hydrokulturen an den gestressten Pflanzen kein positiver Effekt durch die exogene Behandlung mit Spermin beobachtet werden. In allen Fällen kam es zur Ausbildung eines schleimigen Filmes um die Wurzeln, welche sich zudem gelblich verfärbten. Dies kann auf eine mikrobielle Besiedlung zurückgeführt werden, welche durch die absterbenden Wurzeln bedingt ist. Diesen Einfluss könnte Spermin und seine Abbauprodukte durch seine beschriebene toxische Wirkung auf die Wurzeln ausgelöst haben (Pegg 2013).

Während die Expression der *HvSPMS* in den vorliegenden Versuchen durch Trockenstress induziert wurde, konnte keine Veränderung der Expression der *HvSPDS* festgestellt werden. Dies deutet auf eine stärkere Rolle der Sperminsynthasen in der Gerste während Trockenstress. Die Wichtigkeit des Vorhandenseins von Spermin bei verringerter Wasserverfügbarkeit zeigten ebenfalls transgene Gerstenpflanzen mit einer Überexpression bzw. Herunterregulierung von Sperminsynthasen, die in der vorliegenden Arbeit generiert wurden. Die Überexpression der *SPMS2* führte zu einer verringerten Transpirationsrate, während eine RNAi-vermittelte Herunterregulierung der *SPMS2* zu einer erhöhten Transpirationsrate im Vergleich zum Wildtyp führte. Auch konnte in den *SPMS2*-Überexpressoren während Trockenstress ein höherer Chlorophyllgehalt gemessen werden, der mit einer verbesserten Photosyntheseaktivität einhergeht (Khan 2017).

Eine wichtige Rolle in der Seneszenz scheint vor allem *HvSPMS1* in Gerste zuzukommen. So zeigten Messungen an zwei Gerstenkultivaren während der Seneszenz, dass vor allem in der trockentoleranten Sorte Tadmor dessen Expression während der späten Seneszenz weitaus höher ist, als in der als trockensensitiven Sorte Scarlett (Sandra Böhme, Arbeitsgruppe Prof. Humbeck, Pflanzenphysiologie Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, persönliche Mitteilung).

Um einen möglichen Einfluss von Spermin auf die oberirdischen Organe der Gerstenpflanzen zu untersuchen, wurden die stomatäre Leitfähigkeit und die Blattflächentemperatur untersucht. Unter der stomatären Leitfähigkeit ist die Abgabe von Wasserdampf durch die Stomata pro Zeit und Fläche zu verstehen. Man kann damit direkt den Öffnungsgrad der Stomata für Wasserdampf und CO_2 bestimmen (Buckley 2017). Ist die Pflanze Trockenstress ausgesetzt, schließen sich die Stomata der Blätter, und der damit verbundene Transpirationsstop reduziert den Wasserverbrauch. In den vorliegenden Versuchen konnte beobachtet werden, dass eine externe Applikation von Spermin die stomatäre Leitfähigkeit von Gerstenblättern reduziert. Dass Polyamine indirekt an der Schließzellregulation durch Inhibierung der Aktivität von einwärtsgerichteten K^+ -Kanälen beteiligt sind, wurde bereits von Liu und Kollegen (2000) gezeigt. Der indirekte Effekt wird über die Beteiligung von zytoplasmatischen Komponenten, wie die Erhöhung des freien zytosolischen Ca^{2+} durch Polyamine, erklärt. Polyamine wirken spezifisch bei der Abgabe ins Zytosol, was auf eine intrazelluläre Lokalisation des Polyamin-Targets hinweist. Weiterhin wurde gezeigt, dass Spermin, welches positiver geladen ist als Spermidin, keinen stärkeren Einfluss auf den K^+ -Kanal hat. Dies wiederum lässt darauf schließen, dass der Polyamineffekt auf K^+ -Kanäle kein reiner Ladungseffekt ist. Eine Beteiligung an der Regulation aufwärtsgerichteter K^+ -Kanäle konnte in dieser Studie nicht gefunden werden (Liu et al. 2000). Auch eine

Anpassung an Salzstress durch Polyamine erfolgt mittels verringerter Stomataweite und damit einer geringeren Transpiration und reduziertem Wasserverlust (Çavuşoğlu et al. 2007). Eine verminderte Transpiration führt unter anderem zu einer reduzierten Kühlung des Blattes, und die Oberflächentemperatur des Blattes steigt an (Shahenshah und Isoda 2010). Da eine enge Korrelation zwischen Transpiration und Oberflächentemperatur von Blättern besteht, wurden die Pflanzen vor und nach den Porometermessungen mittels Infrarotkamera fotografiert und die Oberflächentemperatur der Blätter ermittelt. Wird durch Trockenheit die Transpiration unterbrochen, kann es durch die damit entstehende höhere Blatttemperatur auch zu Hitzeschäden der Blätter kommen. Der kritische Bereich zum Absterben der Blätter liegt in Kulturpflanzen laut Blum (1985) zwischen 45 und 55°C. Die durch externe Applikation von Spermin reduzierte stomatäre Leitfähigkeit von Gerstenblättern in der vorliegenden Arbeit ging interessanterweise nicht mit einer gesteigerten Blattoberflächentemperatur einher; es konnte kein Unterschied zwischen mit Wasser oder mit Spermin behandelten Blättern beobachtet werden. Der fehlende Einfluss von Spermin auf die Blattoberflächentemperatur könnte zum einen an der Messmethodik liegen, zum anderen können dafür die Umstände des Gewächshauses ursächlich gewesen sein. Durch den steten Zustrom von Frischluft kann es durch Verwirbelung an den Blättern zu veränderten Blattoberflächentemperaturen gekommen sein.

Da die durch Spermin veränderte stomatäre Leitfähigkeit darauf schließen ließ, dass Spermin an der Schließzellregulation beteiligt ist, wurden im Anschluss stomatäre Bioassays an präparierten Epidermisstreifen vorgenommen. Der gesamte auch als stomatärer Komplex genannte Spaltöffnungsapparat wird aus den Schließzellen und den häufig vorkommenden Nebenzellen gebildet. Durch den Innendruck der beiden Schließzellen wird die Stomataweite reguliert. Mit Erhöhung des Innendrucks kommt es zu einer Aufweitung der Spaltöffnung; sinkt der Innendruck bewegen sich die Schließzellen aufeinander zu, und es kommt zum Schluss der Spaltöffnung. Nach Franks et al. (1998 und 2001) kann der Innendruck zum Beispiel in *Vicia faba* von 1 auf bis zu 4 MPa ansteigen. Beeinflusst wird der Turgor durch osmotisch aktive Substanzen, deren Konzentration unter anderem durch Transport- und Biosynthesemechanismen reguliert werden kann. Neben Kalium als Hauptosmotikum ist auch das Kation Ca^{2+} an der Regulierung der Stomataöffnung beteiligt. Die vakuoläre Kaliumkonzentration kann, je nach Öffnungsweite der Stomata, zwischen 100 und 600 mM variieren. Anionen werden zur Kompensierung der elektrischen Ladung benötigt. Neben organischen sind auch anorganische Anionen wie Cl^- beteiligt. Der Transfer von Kalium erfolgt über Kaliumkanäle (Dreyer et al. 2011). Die Regulation dieser Kaliumkanäle kann durch Ca^{2+} und den pH-Wert erfolgen, sowie, wie oben beschrieben, durch Polyamine.

In den für diese Arbeit vorgenommenen Versuchen mit Gersteepidermisstreifen konnte gezeigt werden, dass alle Polyamine die Spaltöffnungsweite in Gerstenpflanzen reduzieren. Obwohl alle Polyamine zu einer signifikanten Verringerung der Spaltöffnungsweite führten, zeigte sich der größte Effekt bei Spermin, gefolgt von Spermidin. Den geringsten Einfluss hatte die externe Applikation von Putrescin. Es wurde jedoch kein Unterschied in der durch externes Spermin induzierten Reduktion der Spaltöffnungsweite bei unterschiedlich trockentoleranten Gerstensorten beobachtet. Nach Yamaguchi et al. (2006) kann der durch Spermin induzierte Stomataschluss unter anderen damit erklärt werden, dass Spermin die Aktivität einiger Ionenkanäle, wie z.B. Ca^{2+} -permeabler Kanäle, moduliert. Dies könnte zum Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ führen und den oben genannten einwärts gerichteten K^+ -Strom durch die Plasmamembran inaktivieren. Dadurch kommt es letztlich zum Stomataschluss. Ein vollständiger Schluss der Stomata, so dass beide Schließzellen keinen Spalt mehr bildeten, konnte in keinem Versuch beobachtet werden. Dies lässt sich möglicherweise durch die Methodik erklären, durch welche die Mesophyllzellen von der Epidermis entfernt wurden. Im Gegensatz zu den Schließzellen wurden die Epidermiszellen größtenteils durch die Präparation geschädigt, da diese über Plasmodesmen mit den Mesophyllzellen verbunden sind. Diese sind jedoch notwendig, um einen ausreichend hohen Gegendruck aufzubauen und damit die Schließzellen zusammen zu pressen. Dies deckt sich mit verschiedenen Literaturangaben zu Experimenten an Schließzellen. So führte in *Commelina communis* 1 mM ABA zu einem Spaltöffnungsschluss von lediglich 87% gegenüber der Öffnungsweite ohne ABA (Trejo et al. 1993).

Da in der vorliegenden Arbeit sowohl ABA als auch Spermin zur Reduzierung der Spaltöffnungsweite bei Gerste führten, wurde untersucht, ob es einen additiven oder synergistischen Effekt zwischen diesen beiden Substanzen gibt. Wurden Spermin und ABA zusammen zu den präparierten Epidermisstreifen gegeben, konnte kein zusätzlicher Effekt beobachtet werden. Dies kann damit erklärt werden, dass 10 μM Spermin allein zu einem fast vollständigen Schluss der Stomata führte. Die Kombination aus ABA und Spermin in einer Konzentration von 10 μM konnte damit nicht zu einer weiteren Reduzierung der Spaltöffnungsweite führen. In weiterführenden Experimenten müsste eine mögliche Wechselwirkung mit geringeren Konzentrationen der beiden Substanzen getestet werden.

Der Spermin-induzierte Stomataschluss war nicht dauerhaft, sondern transient. Dies lässt zum einen den Schluss zu, dass die durch externe Applikation von Spermin induzierte Schließung der Stomata möglicherweise auf einem indirekten Weg, zum Beispiel über die Bildung von ROS, ausgelöst wird. Zum anderen kann aber auch eine Insensitivierung nicht ausgeschlossen werden.

Bereits 2008 beschrieben An et al. einen indirekten Einfluss von Polyaminen auf Schließzellen. So induzierten sowohl Putrescin, Spermidin als auch Spermin durch gesteigerte Konzentrationen an ROS in den Schließzellen das Schließen der Stomata von *Vicia faba*. Die Entstehung von ROS in Pflanzen geschieht durch Photosyntheseprozesse und Atmung permanent. Erhöhte ROS-Produktion kann durch unterschiedlichste Umwelteinflüsse bedingt sein. So kommt es durch Trockenstress, Salzstress, hohe oder niedrige Temperaturen sowie Nährstoffmangel oder Pathogenbefall zu einer gesteigerten ROS-Produktion und -Akkumulation. Wird mehr ROS akkumuliert als abgebaut, führt dies zu oxidativem Stress, welcher in der Folge zu DNA-Schäden, Schäden an Proteinen und Lipiden und letztendlich zum programmierten Zelltod führen kann (Tripathy et al. 2012). ROS ist in der Pflanze auch als Signalmolekül an der Reaktion auf biotischen oder abiotischen Stress beteiligt. Da es sehr spezifische Antworten auf die unterschiedliche ROS-Arten gibt, liegt die Vermutung nahe, dass es unterschiedliche Mechanismen und Sensoren zur ROS-Erkennung gibt. In Pflanzen kann dies über nicht identifizierte Rezeptorproteine erfolgen, über Redox-sensitive Komponenten einschließlich Transkriptionsfaktoren oder durch die direkte Hemmung von Phosphatasen (Tripathy et al. 2012).

Der Anstieg von ROS in Schließzellen könnte durch Aminoxidasen, wie die Polyaminoxidase oder die kupferhaltige Aminoxidase, verursacht werden (Pandey 2017). Bisherige Studien stützen die Annahme, dass die Biosynthese der Polyamine intrazellulär stattfindet. So zeigen Untersuchungen in Reis die Lokalisation des OsSPMS1-Proteins im Nukleus, der Plasmamembran, sowie im Zytosol (Tao et al. 2018). In Arabidopsispflanzen konnte für SPDS-Proteine in den meisten Geweben eine Lokalisation im Zytosol und Nukleus beobachtet werden (Belda-Palazón et al. 2012). Durch Transport in den extrazellulären Raum und dem dortigen Abbau der Polyamine durch die in der Zellwand lokalisierte PAO (Kaur-Sawhney et al 1981, Ghuge et al 2015) resultiert die Freisetzung von H_2O_2 sowie im weiteren Verlauf auch die Produktion von OH-Radikalen (Wang et al. 2019). Die Oxidation der Polyamine erfolgt über zwei unterschiedliche Klassen von Aminoxidasen. Die kupferhaltigen Aminoxidasen (CuAOs) oxidieren bevorzugt Diamine (Putrescin und Cadaverin) und katalysieren dabei hauptsächlich ihre Oxidation an primären Aminogruppen, wodurch 4-Aminobutanal, H_2O_2 und Ammoniak entstehen. Die pflanzlichen CuAOs werden in zwei Gruppen unterteilt. Die erste Gruppe umfasst CuAOs, die typischerweise extrazelluläre Proteine sind und die ein N-terminales Signalpeptid enthalten. Die zweite Gruppe umfasst CuAOs, welche in Peroxisomen lokalisiert sind und ein C-terminales peroxisomales Zielsignal 1 enthalten (Wang et al. 2019). Die flavinhaltigen Polyaminoxidasen (PAOs) oxidieren bevorzugt Spermidin und Spermin. Auch diese können in zwei Gruppen

unterteilt werden. Die erste Gruppe der PAOs ist für den terminalen Katabolismus und damit der Zersetzung der Polyamine Spermidin und Spermin verantwortlich und führt durch die Oxidation von Spermin zu N-(3-aminopropyl)-4-Aminobutanal bzw. durch die Oxidation von Spermidin zu 4-Aminobutanal. Weitere Nebenprodukte dieser Reaktionen sind H_2O_2 und 1,3-Diaminopropan (DAP) (Cona et al. 2006, Tiburcio et al. 2014). Die zweite Gruppe der PAOs katalysiert den Rückkopplungsweg in welchen Spermin zu Spermidin umgewandelt wird bzw. Spermidin zu Putrescin. Weitere Nebenprodukte dieser Reaktion sind 3-Aminopropanal and H_2O_2 (Wang et al. 2019).

Die Überexpression von *ZmPAO* in Tabak induziert den programmierten Zelltod in Wurzeln (Moschou et al. 2008). Ebenso konnte bei Tabakpflanzen gezeigt werden, dass *PAO*-überexprimierende Pflanzen eine erhöhte Toleranz gegenüber biotischem Stress durch Befall mit *Pseudomonas syringae pv tabaci* oder *Phytophthora parasitica var nicotianae* hatten (Moschou et al. 2009).

Wurde in den Stomataversuchen der vorliegenden Arbeit die Oxidation von Spermin durch den Einsatz von Guazatinacetat, einem Inhibitor der Sperminoxidase, verhindert, konnte die Wirkung von extern appliziertem Spermin auf die Spaltöffnungsweite aufgehoben werden. Guazatinacetat ist ein nicht-systemisch wirkendes, aliphatisches Fungizid, welches in der Landwirtschaft verwendet wurde um, speziell Getreide, vor Pilzbefall wie zum Beispiel mit *Fusarium ssp.* zu schützen. Die Wirkung kommt hauptsächlich durch die Inhibierung der Lipidbiosynthese und einer Membranstabilisierung im Pilz zustande (Dreassi et al. 2007). Als starker Inhibitor der Polyaminoxidase-Aktivität wurde Guazatinacetat bereits in verschiedenen Pflanzen, wie Mais, Tabak, Arabidopsis und Weinreben eingesetzt, um sowohl die Oxidation von Polyaminen als auch deren Rückkopplungsweg zu blockieren. Damit hat das Fungizid allerdings auch starke Nebenwirkungen. Bei Langzeitanwendungen in Arabidopsispflanzen konnte eine Wachstumshemmung von Keimlingen oder auch eine Chlorose beobachtet werden (Atanasov et al. 2016). Allerdings gibt es Unterschiede in der Guazatinacetat-Toxizität zwischen Monokotyledonen und Dikotyledonen. Eine mögliche Erklärung könnte, wie auch bei Auxinherbiziden beobachtet, die unterschiedliche Translokation, Perzeption und der unterschiedliche Abbau des Guazatinacetats sein (Kelley et al. 2007). Einhergehend mit der Blockierung der Oxidation von Polyaminen wird auch die Bildung von H_2O_2 gehemmt (Atanasov et al. 2016). Bei Reis wurde so nachgewiesen, dass das durch die Polyaminoxidase gebildete H_2O_2 essentiell für die Keimung ist. In diesen Versuchen konnte auch gezeigt werden, dass Guazatinacetat zwar effektiv die H_2O_2 -Produktion hemmt, aber kaum die von O_2^- (Chen et al. 2016). Der Effekt von Guazatinacetat in der vorliegenden Arbeit könnte somit auch auf die Hemmung der H_2O_2 -Bildung zurückzuführen sein.

Zhang et al. (2001) zeigten, dass der durch H_2O_2 verursachte Stomataschluss durch Applikation des Radikalfängers Ascorbat verhindert wird. In den in dieser Arbeit vorgenommenen Versuchen verhinderte Ascorbinsäure die durch Spermin induzierte Stomataschließung teilweise. Unter den in Pflanzen gefundenen Antioxidantien ist Ascorbinsäure das am häufigsten vorkommende. Seine Konzentration in der Pflanze kann zwischen 10 und 300 mM liegen (Smirnoff et al. 2000). Ascorbinsäure wird durch die Ascorbatperoxidase zum Umwandeln von H_2O_2 in Wasser befähigt. Damit ist Ascorbinsäure in der Lage, Superoxid- und Hydroxylradikale abzufangen (Chen und Gallie 2004). Die nur teilweise Hemmung der Spermin-induzierten Schließung der Spaltöffnung durch Ascorbinsäure deutet auf weitere Wege hin, wie Spermin zum Stomataschluss führen kann.

Zum Nachweis der Bildung von H_2O_2 wurden die Epidermisstreifen zunächst mit 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) angefärbt, welches durch H_2O_2 eine braune Farbe annimmt. Da eine Braunfärbung in den präparierten Epidermisstreifen nicht beobachtet werden konnte, wurde der Nachweis mit dem sensitiveren Farbstoff H_2DCFDA wiederholt. Die durch Spermin verursachte Akkumulierung von H_2O_2 konnte damit deutlich gezeigt werden.

Eine weitere Quelle von ROS sind Plasmamembran-gebundene NADPH-Oxidasen, welche Superoxidradikale bilden und in der Umgebung von Ionenkanälen der Plasmamembran lokalisiert sind (Keller et al., 1998). Pflanzliche NADPH-Oxidasen werden von *RBOH* (respiratory burst oxidase homolog) -Genen kodiert. Superoxidradikale (O_2^-) sind das primäre Produkt der Reduktion von Singulett Sauerstoff. Sie sind sehr instabil und reagieren schnell zum stabileren H_2O_2 weiter - spontan oder mittels Superoxid-Dismutasen (SOD) enzymatisch katalysiert (Fridovich, 1997). Durch die Produktion von ROS ist die NADPH-Oxidase auch an der Aktivierung von Ca^{2+} -Kanälen und damit am Anstieg des $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ beteiligt (Kwak et al. 2003; Desikan et al. 2004; She et al. 2004). In Arabidopsis wurden zwei ROS-produzierende NADPH-Oxidase-Gene in Schließzellen gefunden, *AtrbohD* und *AtrbohF*. In Versuchen mit *AtrbohD/F*-Doppelmutanten wurde gezeigt, dass sowohl die durch ABA induzierte Schließung der Spaltöffnungen inhibiert war, als auch die Produktion von ROS (Kwak et al. 2003). Damit wurde ein Einfluss von ROS als sekundärer Botenstoff der Schließzelle in der Signalleitung durch ABA belegt. Der NADPH-Oxidase-Inhibitor DPI konnte in den Versuchen der vorliegenden Arbeit den durch Spermin induzierten Stomataschluss nicht verhindern. DPI inhibiert die NADPH-Oxidase und damit die Entstehung von Superoxidradikalen. Ein Abbau der durch die NADPH-Oxidase generierten Superoxidradikale durch Polyamine wurde bereits gezeigt (Papadakis et al. 2005). Die Färbung der Epidermisstreifen mittels NBT zeigte in den vorliegenden Versuchen

deutlich eine reduzierte Akkumulation von Superoxidradikalen, wenn der Epidermisstreifen mit Spermin behandelt wurde. Dieses Ergebnis deutet auf eine verminderte Entstehung oder einen Abbau von Superoxidradikalen durch Spermin, was mit dem Abbau der durch die NADPH-Oxidase generierten Superoxidradikale durch Polyamine erklärt werden könnte (Papadakis et al. 2005). Die verminderte Akkumulation von Superoxid zeigt, dass Spermin direkt als Radikalfänger agieren kann. Es gibt noch andere Wege, über die Spermin vor oxidativen Schäden schützen kann. So kann es durch die Bindung an DNA zu deren Konformationsänderung kommen und die DNA dadurch weniger anfällig für die Oxidation gemacht werden. Ebenso führt die Bindung von Spermin an RNA zu einer geänderten Konformation und verstärkt damit selektiv die Wechselwirkungen mit anderen Molekülen in der Zelle (Katz et al. 2017).

Interessanterweise wirkt sich Spermin damit entgegengesetzt auf die Bildung von ROS aus. Einerseits erniedrigend durch Abbau von Superoxidradikalen, andererseits erhöhend durch Generierung von H_2O_2 . In dieser Arbeit hatte Spermin keine hemmende Wirkung auf den ABA-induzierten Stomataschluss, der von NADPH-Oxidasen abhängig ist. Dies könnte zu einer auf eine erhöhte Bildung von Superoxid zurückgeführt werden, die die Kapazität von Spermin überschritt. Andererseits könnten Polyaminoxidasen (PAO) neben NADPH-Oxidasen direkt an der ABA-Reaktion beteiligt sein. Durch die Versuche mit dem PAO-Inhibitor Guazatinacetat, dem ROS-Scavenger Ascorbinsäure sowie mittels der Färbungen der Epidermisstreifen konnte gezeigt werden, dass die Wirkung des extern applizierten Spermis auf die Stomata zumindest teilweise auf eine indirekte Wirkung des Polyamins, durch die Bildung von H_2O_2 über die PAO, zurückzuführen ist. Ein Effekt weiterer Abbauprodukte der PAO kann aber nicht ausgeschlossen werden.

Der pH-Wert ist ein essentieller Faktor für den Ablauf vieler biochemischer Reaktionen. Die meisten Proteine funktionieren zum Beispiel nur in einem sehr engen pH-Bereich. Extreme pH-Bedingungen können zur Denaturierung und Inaktivierung der Proteinfunktion führen. Eine genaue Regulation des pH-Wertes ist daher für die Sicherstellung der korrekten Funktion von Proteinen wichtig (Garcia-Moreno. 2009). In Schließzellen spielt der pH-Wert eine Schlüsselfunktion in der Regulierung der Öffnungsweite (Geilfus 2017). Das Schließen der Stomata ist assoziiert mit der Freisetzung von K^+ aus der Vakuole und dem Ausstrom von K^+ über die Plasmamembran. Der apoplastische pH-Wert hat einen direkten Effekt auf einwärtsgerichtete K^+ -Kanäle sowie auf Anionenkanäle in der Plasmamembran von Schließzellen (Liu et al. 2000). In hyperpolarisierten Schließzellen führt die apoplastische Ansäuerung zur Hemmung der K^+ -Aufnahme und in depolarisierten Schließzellen führt sie zum verstärkten K^+ -Ausstrom (Roelfsema et al. 2008). Dem K^+ -Ausstrom geht ein

Ca^{2+} -Einstrom über die Plasmamembran voraus, resultierend in der Erhöhung des freien zytosolischen Ca^{2+} . Es wird angenommen, dass es einen synergistischen Effekt von erhöhten zytosolischen pH-Werten und der Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ gibt, welches die Plasmamembran der Schließzellen depolarisiert (Irving et al. 1992).

Wurden in dieser Arbeit Gersteepidermisstreifen mit Inkubationspuffer unterschiedlichen pH-Wertes behandelt, wurde mit steigendem pH-Wert eine Reduzierung der stomatären Öffnungsweite beobachtet. In der Vergangenheit wurde bereits eine säurebedingte Öffnung von Stomata gezeigt (Jinno et al. 1982; Bittisnich et al. 1987). Verschiedene Stressoren wie Versalzung, Trockenheit oder Pilzbefall führen zu einem Anstieg des pH im Apoplasten (Geilfus 2017). Die apoplastische Protonenkonzentration sinkt nur temporär. Während Trockenheit führt die Alkalisierung des Apoplasten dazu, dass ABA in seine Anionenform dissoziiert wird (Hartung 1983, Slovik et al., 1995). Als nun vorliegende schwache Säure verbleibt ABA im alkalischen Apoplasten in der Umgebung der Schließzellen und wird dort akkumuliert. Dies führt zur Schließung der Stomata.

In der vorliegenden Arbeit wurden Versuche zum Spermin-induzierten Stomataschluss mit freiem Spermin durchgeführt, welches in Inkubationspuffer bei einer Konzentration von 10 μM einen pH-Wert von 6,21 besaß. Dies führte zum Schließen der Stomata. In Experimenten mit Spermin-HCl, welches in Inkubationspuffer einen pH-Wert von 6,15 aufwies, konnte beobachtet werden, dass Spermin auch bei diesem physiologischem pH-Wert zum Stomataschluss führt. Dies zeigt, dass der Effekt von Spermin nicht allein auf einen erhöhten pH-Wert zurückzuführen ist. Durch eine Stimulierung der H^+ -ATPase durch Spermin (Cogo et al. 2018) kann es dennoch zur Erhöhung des zytosolischen pHs kommen, was zu einer Erhöhung des freien zytosolischen Ca^{2+} führen kann. Spermin ist das am stärksten positiv geladene Polyamin, wodurch es stärker in Wechselwirkung mit anderen Molekülen oder Proteinen gehen kann. Die Wirkung des Spermins ist weiterhin abhängig vom H^+ -Transport in Pflanzenzellen (Pandolfi et al. 2010, Dutra et al. 2013, Pottosin et al. 2014). Der Einfluss auf das Membranpotential, ob hyperpolarisiert bei geringen Sperminkonzentrationen oder depolarisiert bei hohen Sperminkonzentrationen, ist möglicherweise an die H^+ -ATPase-Aktivität gekoppelt (Pottosin et al. 2014). Spermin hat durch seinen hohen Grad an positiver Ladung einen größeren Einfluss auf die P-Typ H^+ -ATPase-Aktivität und den H^+ -Fluss in Pflanzenzellen als Spermidin und Putrescin (Garufi et al. 2007, Pandolfi et al. 2010, Pottosin et al. 2014). Die Alkalisierung des Zytosols hätte dann als vorgelagertes Signal einen Einfluss auf $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ und der Anstieg des $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ würde dann zum Schließen der Stomata führen.

4.2 Interaktion von Polyaminen und Calcium

Ca^{2+} spielt eine wesentliche Rolle als intrazellulärer Botenstoff (White et al. 2003). Pflanzen haben effiziente Mechanismen entwickelt, um die freie Ca^{2+} -Konzentration im Zytosol auf einem gleichbleibend niedrigen Niveau zu halten. Die Konzentration von freiem Ca^{2+} im Zytosol liegt in der Regel zwischen 70 und 150 nM, während sie im Apoplasten bis zu 1 mM betragen kann (Dodd et al. 2006, Medvedev 2018). Durch unterschiedliche Stressoren ausgelöste Signale werden von spezifischen Rezeptoren und Ca^{2+} -permeablen Kanälen registriert. Durch den schnellen Einstrom von Ca^{2+} in das Zytosol und damit der lokalen Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ kommt es zur zellulären Antwort auf eine Vielzahl von Reizen aus der Umwelt, wie biotischen und abiotischen Stressen, als auch auf unterschiedliche Anforderungen bezüglich der Entwicklung von Pflanzen (Sanders et al. 2002, McAinsh und Pittmann, 2009). In Schließzellen von Arabidopsis verursachen verschiedene Reize, wie ABA, Kälte oder H_2O_2 , Ca^{2+} -Signale in Form von Spikes und Oszillationen im Zytosol (Allen et al. 2001). Der Anstieg des $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ aktiviert unterschiedliche Ionenkanäle und verursacht dadurch den Schluss der Stomata (Blatt et al. 1990; Gilroy et al. 1990). Die Regulierung des $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ ist somit ein wichtiger Faktor in der Toleranz gegen Trockenstress.

Während Polyamine eine Reihe von Kationenkanälen blockieren (Dobrovinskaya et al. 1999, Liu et al. 2000) und damit den Ca^{2+} -Einstrom beeinflussen, könnte durch Polyaminoxidation entstehendes H_2O_2 Kanäle in der Plasmamembran, welche für den Einstrom des Ca^{2+} wichtig sind, beeinflussen (Pei et al. 2000). Damit haben Polyamine potentiell entgegengesetzte Effekte auf Ca^{2+} -Ströme.

Wie unter 4.1 besprochen, wird Spermin durch die Polyaminoxidase oxidiert, wobei unter anderem H_2O_2 entsteht, welches einen Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ initiieren kann. Es wurde daher in einem Versuch an Gersteepidermisstreifen untersucht, ob extrazelluläres Ca^{2+} , dass als wichtige Quelle für den $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ -Anstieg dient, für die durch Sperminapplikation verursachte Schließung der Spaltöffnungen erforderlich ist. Experimente mit dem Ca^{2+} -Chelator EGTA zeigten, dass ein Abfangen von externem Ca^{2+} die durch Spermin induzierte Stomataschließung teilweise verhindert, jedoch nicht vollständig. Dies deutet auf eine Beteiligung Ca^{2+} -unabhängiger Prozesse oder von Ca^{2+} , welches aus internen Speichern wie dem ER, der Vakuole oder den Mitochondrien freigesetzt wird.

Einen weiteren Hinweis darauf, dass Polyamine und Ca^{2+} interagieren, geben Versuche mit Arabidopsis-Doppelmutanten mit einem Mangel an Spermin und Thermospermin. Diese sind hypersensitiv gegenüber erhöhten Konzentrationen von NaCl und KCl. Des Weiteren zeigen diese Pflanzen ein vermindertes Wachstum auf Ca^{2+} -Mangel-Medium. Es wurde vermutet, dass es durch das fehlende Spermin zu einer unausgeglichene

Ca²⁺-Homöostase kommt; die Hypersensitivität der Mutanten gegenüber NaCl konnte durch eine Behandlung mit Ca²⁺-Kanalblockern vermindert werden (Yamaguchi et al. 2006).

Um zu untersuchen, ob Spermin zu Veränderungen der [Ca²⁺]_{cyt} in ganzen Pflanzen führt, wurden in der vorliegenden Arbeit erstmals [Ca²⁺]_{cyt}-Messungen an Gerste durchgeführt. Wurde Spermin auf einen mit *Aequorin* transformierten Gerstenkeimling appliziert, konnten mittels Photonenzählkamera Veränderungen der zytosolischen Ca²⁺-Konzentration in der Wurzel beobachtet werden; im Spross konnten nur sehr schwache Änderungen registriert werden. Die Pflanze Gerste erwies sich jedoch aus mehreren Gründen für die Beobachtung Spermin-induzierter Veränderungen der [Ca²⁺]_{cyt} als ungeeignet. Zum einen stellte die Bereitstellung von Pflanzenmaterial ein Problem dar. Die Anzahl der stabil transformierten Pflanzen war beschränkt, und die Vermehrung und somit die Gewinnung einer ausreichenden Menge an Samen war zeitintensiv. Zum anderen variierte die Lumineszenz in Spross und Wurzel stark, und es war schwierig, stabile Signale zu erhalten. Konnten in einem Experiment Reaktionen in allen Organen, wenn auch im Spross nur sehr geringe, detektiert werden, zeigte sich in der darauffolgenden Wiederholung keine Reaktion oder nur eine in den Wurzeln. Daher wurden weitere Untersuchungen zu Spermin-induzierten Ca²⁺-Signalen an *Aequorin*-transformierten Arabidopsispflanzen durchgeführt. Neben einer besseren Verfügbarkeit von Saatgut der Reporterlinie war die Anzucht weniger zeitintensiv, und die Experimente waren methodisch einfacher und reproduzierbarer. Wurden Arabidopsispflanzen mit Spermin behandelt, zeigten sich in Abhängigkeit der Sperminkonzentration unterschiedlich starke [Ca²⁺]_{cyt}-Antworten. Dass die Höhe der [Ca²⁺]_{cyt}-Veränderung von der Stärke des externen Stimulus abhängt, ist von anderen Stimuli bekannt. Dosisabhängige Ca²⁺-Signale wurden zum Beispiel bei unterschiedlichen Salzkonzentrationen, H₂O₂ aber auch hohen Temperaturen oder Ozon beobachtet (Bose et al. 2011). In Arabidopsispflanzen wurde nach einer Sperminapplikation eine biphasische Reaktion der [Ca²⁺]_{cyt} beobachtet. Ein erstes Signal zeigte sich in der Wurzel, ein zweites Signal trat später im Spross auf. Auch unter Sauerstoffmangel können zwei aufeinander folgende Ca²⁺-Signale beobachtet werden. Zunächst kann ein schneller Anstieg der [Ca²⁺]_{cyt} beobachtet werden, gefolgt von einem zweiten langsamen Anstieg der [Ca²⁺]_{cyt} über mehrere Stunden (Sedbrook et al. 1996). Dahingegen zeigt sich die Antwort auf Salzstress lediglich mit einer einzelnen Veränderung der [Ca²⁺]_{cyt} (Tracy et al. 2008). Dass nach einer Separation von Wurzel und Spross lediglich die Ca²⁺-Signale in der Wurzel detektiert werden konnten und das zweite Signal im Spross fehlte, könnte ein Hinweis darauf sein, dass Spermin neben einem lokalen Ca²⁺-Signal auch ein systemisches Signal in der Pflanze auslöst. Auch zu Wurzelspitzen von

Arabidopsis lokal applizierter Salzstress initiiert ein systemisches Ca^{2+} -Signal (Gilroy et al. 2016). Das Ca^{2+} -Signal breitete sich in dieser Reaktion von der Wurzel ausgehend über den Spross im gesamten Keimling aus. Salzstress induziert dabei neben Ca^{2+} - auch ROS-Wellen. Die ROS-Wellen werden durch die Plasmamembran-lokalisierte NADPH-Oxidase RBOHD (Respiratory Burst Oxidase Homolog D) katalysiert und diffundieren durch den Apoplasten. Dies aktiviert ROS-sensitive Ca^{2+} -Kanäle in der Plasmamembran, welche dann Ca^{2+} in das Zytosol leiten. Dieser Anstieg von $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ aktiviert TPC1-Proteine welche dann entweder direkt oder indirekt die Freisetzung von Ca^{2+} aus der Vakuole vermitteln. In *TPC1*-Knockoutmutanten ist das erste Ca^{2+} -Signal auf wahrgenommenen Salzstress nicht verändert; allerdings ist die Ausbreitungsgeschwindigkeit des systemischen Signals stark reduziert (Gilroy et al., 2016). Einen Einfluss auf die Salztoleranz hat diese Verringerung aber nicht. Lediglich in *TPC1*-Überexpressoren konnte eine erhöhte Salztoleranz gezeigt werden. Es wird daher angenommen, dass es ein Zusammenspiel mit weiteren systemischen Signalwegen gibt. Diese könnten elektrischer oder auch hormoneller Natur sein. Die Freisetzung von Ca^{2+} aus der Vakuole könnte zum Beispiel zu einer weiteren ROS-Produktion durch Aktivierung von NADPH-Oxidasen führen. Ein lokales Signal, in diesem Fall NaCl, kann damit zunächst zur Erhöhung von zytosolischen freiem Ca^{2+} und ROS führen, welche im lokalen Gewebe, auf welches der Stress einwirkt, zur Membrandepolarisation bzw. -repolarisation führt. Dies löst neben ROS- und Ca^{2+} -Wellen zum Beispiel auch elektrische Wellen aus. Es kommt in der Folge zu einer Akkumulation von ROS im Zielgewebe, wo die Stressantwort stattfindet (Gilroy et al. 2016, Evans et al. 2006).

Systemische $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ -Veränderungen in Arabidopsis werden auch durch den Fraß von *Spodoptera littoralis* Raupen an Blättern ausgelöst. Kiep et al. (2015) zeigten erstmalig, dass der Raupenfraß neben einer unmittelbaren Reaktion am befallenen Blatt auch ein systemisches Ca^{2+} -Signal auslöst. Dieses zweite Signal breitete sich innerhalb weniger Minuten vom ursprünglich befallenen Blatt auf benachbarte Blätter aus, wo es dem Stimulus entsprechende Abwehrmaßnahmen auslösen kann.

Für Polyamine konnte gezeigt werden, dass sie die Plasmamembran durchqueren und dadurch in unterschiedlichem Ausmaß depolarisieren (Potossin et al. 2014). Die Aufnahme von Polyaminen über die Plasmamembran erfolgt über verschiedene Transportwege. Diese Wege können kanalvermittelt und transportervermittelt sein (Pistocchi et al. 1998). Auch kann die Polyaminaufnahme durch Ca^{2+} stimuliert werden; hohe externe Ca^{2+} -Konzentrationen hemmen jedoch die Polyaminaufnahme (Antognoni et al. 1994). Die Polyaminaufnahme geschieht selektiv für Polyamine gegen anorganische Kationen; Polyamine teilen ihre Transportwege nicht mit anderen Kationen

(Potossin et al. 2014). Die unterschiedliche Depolarisation durch die verschiedenen Polyamine (Spermin > Spermidin > Putrescin) hängt wahrscheinlich mit der Richtung der Netto H^+ -Ströme zusammen, welche durch die einzelnen Polyamine induziert werden (Potossin et al. 2014). Dies hängt wiederum mit dem direkten Einfluss auf H^+ -Pumpen zusammen. Zum einen können die H^+ -ATPase Pumpen gehemmt oder aktiviert werden, was entweder zu einem H^+ -Einstrom (Spermin) oder H^+ -Ausstrom (Putrescin) führt. Der H^+ -Gradient beeinflusst wiederum die in der Plasmamembran lokalisierte Ca^{2+} -Transporter Aktivität; für zwei H^+ -Protonen wird ein Ca^{2+} -Ion ausgetauscht (Beffagna et al., 2000, Tun et al. 2006; Bose et al. 2011).

Für Spermin konnte darüber hinaus eine konzentrationsabhängige Beeinflussung der H^+ -Pumpe nachgewiesen werden. Bei hohen Sperminkonzentrationen (1 mM) kommt es zur Hemmung, während niedrige Konzentrationen (0,1 mM) eine vorübergehende Stimulierung zur Folge hat (Potossin et al. 2014). In den vorliegenden Versuchen wurde mit hohen Sperminkonzentrationen gearbeitet, was eine Hemmung der H^+ -Pumpe verursachen könnte. Wurden in Versuchen an Erbsen (*Pisum sativum*) Ca^{2+} -Kanäle mit Inhibitoren blockiert, wurde ebenfalls der H^+ -Fluss gestört. Dies weist auf ein Zusammenspiel von Ca^{2+} und H^+ hin (Potossin et al. 2014). Wenn also in den Versuchen an Gerste die H^+ -Pumpen durch die hohen Spermingehalte gehemmt werden, müsste dies auch Auswirkungen auf die Ca^{2+} -Flüsse haben. Da aber trotz der hohen Sperminkonzentration Spermin-induzierte Ca^{2+} -Signale gefunden wurden, kann die Hauptaktivität von Spermin nicht in der direkten oder indirekten Blockierung von Ca^{2+} -Flüssen liegen. Alternativ könnte Spermin durch Anreicherung im Apoplasten und der dortigen Oxidation die ROS-Akkumulation beeinflussen. Auch als Reaktion auf Trockenstress kommt es unter anderem zu einer erhöhten Konzentration von Polyaminen und ihrer Verlagerung in den Apoplasten (Moschou et al. 2009). Dort erfolgt dann die Oxidation der Polyamine durch die PAO, die Entstehung von H_2O_2 und daraus Hydroxylradikalen welche den Ca^{2+} -Einstrom aktivieren (An et al. 2008; Moschou et al. 2008), wobei die Höhe der apoplastischen H_2O_2 -Konzentration von der PAO abhängig ist. Gesteigerte Aktivitäten der PAO resultieren in hohen Konzentrationen von H_2O_2 und können damit den programmierten Zelltod auslösen, während moderate Aktivitäten der PAO und damit auch die moderate Akkumulation von H_2O_2 zur Expression von Trockenstress-induzierten Genen führt (Moschou et al. 2008). In den vorliegenden Versuchen wurde die Entstehung von ROS über Spermin durch Ascorbinsäure abgefangen. Dies führte sowohl in ganzen Pflanzen als auch in einzelnen Schließzellen dazu, dass das durch Spermin ausgelöste zytosolische Ca^{2+} -Signal in seiner Höhe abgeschwächt wurde. Ebenso führte die Inhibierung der Polyaminoxidase zu einer Reduzierung der $[Ca^{2+}]_{cyt}$ -Veränderung.

In Gerstenpflanzen blockieren oder hemmen zytoplasmatische Polyamine bei physiologischem pH-Wert ladungsabhängig den schnellaktivierenden vakuolären Kationenkanal (fast-activating vacuolar channel, FV-Kanal) (Dobrovinskaya et al. 1999). Hierbei zeigten die verschiedenen Polyamine unterschiedliche inhibitorische Wirkung. Während Spermin bereits in Konzentrationen von einigen μM eine inhibitorische Wirkung zeigt, sind es für Spermidin einige hundert μM und für Putrescin Konzentrationen im Bereich von einigen mM. Unter ungestressten Bedingungen enthalten Zellen der Blätter von Gerste 50-100 μM Putrescin und Spermidin. Für Spermin liegen die Gehalte bei 10-30 μM (Brüggemann et al. 1998). Die unbekannte Lokalisation muss hierbei allerdings berücksichtigt werden. Jede Veränderung dieser Konzentrationen beeinflusst die Aktivität des FV-Kanals. Die Modulierung von Ionenkanälen durch Polyamine kann durch deren direkte Bindung an Kanalproteine und anderer, der Membran zugehörigen Komponenten erfolgen (Brüggemann et al. 1998). Eine Inhibierung auch des langsamaktivierenden Kanals (slow-activating vacuolar channel, SV-Kanal) aus der Wurzel von roten Rüben beschreiben Dobrovinskaya et al. (1999). Dieser dient der Freisetzung von K^+ und Ca^{2+} aus der Vakuole in das Zytoplasma, während der FV-Kanal eine hohe Selektivität für K^+ aufweist, aber nicht permeabel für Ca^{2+} ist (Dobrovinskaya et al. 1999). Somit kann das Polyamin Spermin den Strom von Kationen über die Blockierung von SV und FV-Kanälen verhindern. TPC1, ein vakuolärer, Ca^{2+} -permeabler SV-Kanal spielt in der systemischen Ca^{2+} -Signalisierung eine wichtige Rolle. Für Spermin könnte damit ebenfalls eine systemische Signalwirkung auf Ca^{2+} -Flüsse über die Membran postuliert werden. Die Relevanz von systemischen wirkenden Spermin ist aber noch nicht geklärt. Die nachfolgenden Prozesse und der genaue Mechanismus dieser systemischen Sperminsignale müssen weiter untersucht werden. Zudem ist unklar, ob diese Prozesse bei externer Applikation von Spermin, wie in dieser Arbeit praktiziert, eine Rolle spielen.

4.3 Sperminsynthesen in Gerste und Arabidopsis

Phylogenetische Vergleiche unterschiedlicher Spermin- und Spermidinsynthesen zeigten, dass sich Spermin- und Spermidinsynthesen evolutionär unabhängig entwickelten, jedoch enger verwandt sind als die Sperminsynthase und das *ACL5*-Gen, welches für die Thermosperminsynthase kodiert (Belda-Palazón et al. 2012). Das Vorhandensein des Exons II in pflanzlichen Sperminsynthesen und insbesondere der Exons IV und XI in Monokotyledonen ist ein besonderes Merkmal, um die Abgrenzung zur Spermidinsynthase vornehmen zu können. Ein Vergleich der Proteinsequenzen von bereits gefundenen Spermin- und Spermidinsynthesen in verschiedenen Pflanzen zeigt Bereiche mit ausschließlich in Sperminsynthesen konservierten Aminosäuren, mit

ausschließlich in Spermidinsynthasen konservierten Aminosäuren und Aminosäuren, die sowohl in Spermin- als auch in Spermidinsynthasen in gleicher Anordnung vorliegen (Rodríguez-Kessler et al. 2010). Die Anzahl von Sperminsynthasen unterscheidet sich bei einzelnen Pflanzenarten. Während zum Beispiel in *Arabidopsis thaliana* nur eine Sperminsynthase (AtSPMS) gefunden wurde, sind es in *Zea mays* (ZmSPMS1, 2) und *Oryza sativa* (OsSPMS1, 2) zwei (Pegg et al. 2010, Rodríguez-Kessler et al. 2010). In der vorliegenden Arbeit wurden auch für Gerste zwei Sperminsynthasen (HvSPMS1, 2) gefunden. In Kooperation mit Sebastian Pietack (Institut für Pharmazie, MLU Halle-Wittenberg) wurden für *HvSPMS1* und 2 10 Introns mit unterschiedlicher Länge sowie 11 gleich lange Exons gefunden (Pietack 2019). Dies deckt sich mit Literaturangaben zur Anzahl der Introns und Exons in Sperminsynthasen. So konnten auch für die Sequenzen der Sperminsynthasen aus Reis und Mais jeweils 10 Introns und 11 Exons nachgewiesen werden (Rodríguez-Kessler, et al. 2010). Ein Unterschied zu SPMS-Genen in Dikotyledonen ist, dass solche in Monokotyledonen ein zusätzliches Exon enthalten, welches eine PEST-reiche Region am C-Terminus kodiert. Diese ist wahrscheinlich an der Kontrolle des SPMS-Proteinabbaus in Monokotyledonen beteiligt (Rodríguez-Kessler et al. 2010).

Stellt man bekannte N-Aminopropyltransferasen unterschiedlicher Organismen gegenüber, lassen sich zwei voneinander abgrenzende Gruppen bilden. Die eine Gruppe bildet die SPMS/SPDS-Gruppe und die zweite die ACL5-Gruppe. In der ersten finden sich die Spermin- und Spermidinsynthase ähnlichen N-Aminopropyltransferasen und in der zweiten Gruppe die der in *Arabidopsis thaliana* gefundenen ACL5-Thermosperminsynthase ähnlichen N-Aminopropyltransferasen (Knott et al. 2007). Die in Gerste gefundenen Sperminsynthasen lassen sich in die Gruppe der SPMS/SPDS einordnen. Prinzipiell sind die Sperminsynthasen der SPMS/SPDS-Gruppe eng verwandt mit Spermidinsynthasen. Die Aminopropyltransferasen der ACL5-Gruppe zeigen nur eine geringe Sequenzidentität zu Enzymen der SPMS/SPDS-Gruppe (Hanzawa et al. 2000; Panicot et al. 2002). Ein Sequenzvergleich der Proteine von HvSPMS1 und HvSPMS2 zeigte eine Sequenzidentität von 78% zueinander. Zu den bekannten SPMS-Proteinsequenzen aus Reis und Mais sind es 76-84%.

Die phylogenetische Einordnung der gefundenen HvSPMS1 und 2 in die Gruppe der Sperminsynthasen wird durch enzymatische Aktivitätstests bestätigt, in welchen gezeigt wurde, dass beide SPMS-Proteine eine deutliche und ausschließliche SPMS-Aktivität besitzen (Pietack 2019).

Eine Promotoraktivität des *Spermidinsynthase*-Gens und der beiden *Spermidinsynthase* Gene kann während unterschiedlichster Entwicklungsstadien von *Arabidopsis thaliana* beobachtet werden. Die Expression der *AtSPMS* zeigt einen tendenziellen Anstieg mit

zunehmenden Alter, und vor allem in der Seneszenz ist die Expression deutlich erhöht. Für die *AtSPDS* kann während der Keimung eine gesteigerte Expression beobachtet werden. Einträge in Datenbanken und die Daten der vorliegenden Arbeit zeigen für Gerste ein ähnliches Expressionsmuster für die *HvSPMS*- und die *HvSPDS*-Gene. Auch hier kann für die *HvSPDS1* eine gesteigerte Expression während der Keimung gezeigt werden. Die Expression der beiden *HvSPMS* schwankt über den Entwicklungszeitraum und steigt zur Seneszenz etwas an. Eine verzögerte Blattalterung ist mit erhöhten Spermingehalten in der Pflanze assoziiert (Sobieszczuk-Nowicka, 2017). Die niedrigsten Expressionswerte der *HvSPMS*s wurden hier während des Bestockens und Schossens gemessen. Da transgene Gerste mit Überexpression von *HvSPMS*-Genen eine verminderte Anzahl an Bestockungstrieben zeigt (Khan 2017), kann angenommen werden, dass Spermin während dieser Phase in Gerstenpflanzen eine regulatorische Funktion übernimmt. Ein Zusammenhang zwischen Polyaminen und verschiedenen Phasen der Entwicklung von Pflanzen wurde oft diskutiert. So wird deren Beteiligung an der Embryogenese, Organentwicklung, Blütenbildung und der Entwicklung der Frucht sowie der Blattseneszenz beschrieben (Kusano et al., 2008). Ebenso wird eine Wechselwirkung zwischen Polyaminen und Pflanzenhormonen wie Gibberellinen, Auxin und Ethylen beschrieben (Alcázar et al., 2010). Versuche an Weizen zeigten eine Erhöhung der Kornfüllrate und des Korngewichtes, wenn die Pflanzen mit externen Spermin behandelt wurden (Liu et al. 2013). Für Arabidopsispflanzen konnte gezeigt werden, dass externe Polyamingaben die Blüte fördern (Applewithe et al. 2010).

Die Expression der einzelnen Polyaminsynthasen in *Arabidopsis thaliana* ist individuell von äußeren Einflüssen abhängig. So ist die Expression von *AtSPDS1* erhöht durch Trockenheit und ABA, die von *AtSPDS2* durch Cytokinin, während die Expression von *AtSPMS* durch Trockenheit, Hitze und ABA induziert wird (Kusano et al. 2015). Wurden die Pflanzen Salzstress unterzogen, zeigte sich eine gesteigerte Promotoraktivität der *AtSPMS* in allen Organen außer Kotelydonen (Sagor et al. 2011). In Arabidopsispflanzen wird des Weiteren die Expression von *ACL5* durch Auxin induziert (Hanzawa et al. 2000, 2002). Eine eingehendere Untersuchung, auch auf zellspezifischer Ebene, des Expressionsmusters von Genen des Polyaminstoffwechsels der Gerste sollte Gegenstand weiterführender Arbeiten zur Aufklärung der genauen Funktion von Polyaminen in dieser Pflanze sein.

4.4 Transformation von Gerste zur Analyse der Bedeutung von SPMS-Genen

Die Erzeugung transgener Gerstenpflanzen kann über verschiedene Wege erreicht werden. Als Transformationsmethoden dient zum Beispiel der direkte DNA-Transfer in isolierte Protoplasten, die mittels Partikelbeschuss-vermittelte Übertragung von DNA, sowie die Agrobakterien-vermittelte Transformation. Jede dieser Methoden benötigt bestimmte Voraussetzungen zur erfolgreichen Erzeugung transgener Pflanzen. So ist für die Protoplastenmethode die Langzeitetablierung von embryogenen Suspensionskulturen nötig, und oft sind die Regenerate unfruchtbar und weichen phänotypisch von nicht transgenen Pflanzen ab (Davey et al. 1991; Rhodes et al. 1988). Allen genannten Methoden gemein ist die Etablierung einer effizienten Gewebekultur als Grundvoraussetzung zur Erzeugung transgener Pflanzen. Die Anzucht der Gerstenpflanzen erfolgte in dieser Arbeit im 14-tägigen Rhythmus. Dies war nötig, da sich die Embryonen nur in einem sehr kleinen Zeitrahmen von fünf bis sieben Tagen in einem für die Transformation geeigneten Stadium befanden. Die Ernte der unreifen, grünen Embryonen erfolgte 12-14 Tage nach der Anthese. Eine Ernte vor oder nach diesem Zeitraum resultierte in einer verminderten Anzahl sich entwickelnder transgener Kalli und daraus entstehender transgener Pflanzen. Konnten dennoch grüne Pflanzen regeneriert werden, zeigten diese oft eine schlechte Bewurzlungsrate, das Umsetzen der Pflanzen vom Medium in Erde wurde nicht vertragen, und die Pflanzen starben ab (Daten nicht gezeigt). Ein Befall der Spenderpflanzen mit biotischen Stressoren wie Blattläusen oder Thripsen musste ebenfalls verhindert werden. Trat ein Befall auf, wurde dieser zwar mit chemischen Behandlungsmitteln effektiv bekämpft, aber dies führte auch zur Produktion von Embryonen mit verringerter Kompetenz zur Transformation (Daten nicht gezeigt). Diesen Effekt konnten bereits Bartlett und Kollegen beobachten (Bartlett et al. 2008). Ein ähnlich enger Zeitrahmen galt auch für die Kalluskultur. In der Regel entwickelten sich die Kalli drei bis sechs Wochen nach der Co-Kultivierung mit Agrobakterien. Aus diesen Kalli konnten meist grüne, vitale Sprosse regeneriert werden, welche auch auf dem entsprechenden Wurzelinduktionsmedium eine starke Bewurzelung zeigten. Manchmal dauerte die Kallusbildung auch länger, jedoch konnten daraus meist keine Pflanzen regeneriert werden. Dass eine verlängerte Kalluskulturphase zur Häufung von somatischen Mutationen und damit zur Albinobildung oder zu nicht-fertilen Pflanzen führt, zeigten bereits Lemaux et al. (1999).

Prinzipiell ist die monokotyledone Gerste kein natürlicher Wirt von *Agrobacterium tumefaciens* und damit auch weniger aufnahmefähig bezüglich der Agrobakterium-vermittelten Transformation. Begrenzt ist diese Methode zudem von der starken

Genotypabhängigkeit. Erste Versuche mit Agrobakterien erfolgten mit dem Gerstekultivar Golden Promise (Tingay et al., 1997). Versuche mit anderen Kultivaren, wie australischen Kultivaren (Murray et al., 2004) oder einigen nordischen Kultivaren (Tiidema und Truve, 2004) zeigten eine wesentlich geringere Effizienz. In unseren Versuchen konnten *SPMS1*- und *SPMS2*-Überexpressoren in Gerste mit einer Effizienz von 42% bzw. 47% erzeugt werden. Für die RNAi-vermittelte Herunterregulierung von *SPMS1* und *SPMS2* lag die Effizienz deutlich niedriger mit 7% bzw. 12%. Dass die Effizienz von Agrobakterien-vermittelter Transformation schwankt, ist bekannt und in diversen Literaturangaben zu finden. So wurden Werte von 2,6-6,7% (Shrawat et al. 2007), 2–12% (Matthews et al. 2001), 4,4-9,2% (Murray et al. 2004) und 21,7% (Hensel et al. 2008) beschrieben. Die deutlich geringere Transformationsrate der RNAi-Pflanzen könnte ein Hinweis darauf sein, dass Spermin während der frühen Entwicklung in Gerste eine wichtige Rolle spielt.

Die transgenen Gerstenpflanzen wurden nach erfolgreicher Anzucht in Erde zur Samenreife gebracht, geerntet und in einem Folgeprojekt zur weiteren genotypischen und phänotypischen Analyse verwendet. Dieses zeigte, dass die *SPMS*-Überexpression zu reduzierter stomatärer Leitfähigkeit führt, während die Knockdown-Pflanzen erhöhte Werte aufwiesen (Khan, unveröffentlicht), was die Experimente mit extern appliziertem Spermin in dieser Arbeit bestätigte.

5 Literaturverzeichnis

Alcázar R., Altabella T., Marco F., Bortolotti C., Reymond M., Koncz C. (2010) Polyamines: molecules with regulatory functions in plant abiotic stress tolerance. *Planta* 231, 1237–1249.

Alcázar R., Marco F., Cuevas J.C., Patrón M., Ferrando A., Carrasco P., Tiburcio A.F., Altabella T. (2006) Involvement of polyamines in plant response to abiotic stress. *Biotechnology Letters* 28, 1867–1876.

Ali R.M. (2000) Role of putrescine in salt tolerance of *Atropa belladonna* plant. *Plant Science* 152, 173-179.

Allen G.J., Chu S.P., Harrington C.L., Schumacher K., Hoffmann T., Tang Y.Y. (2001) A defined range of guard cell calcium oscillation parameters encodes stomatal movements. *Nature* 411, 1053–1057.

Allen G.J., Kuchitsu K., Chu S.P., Murata Y., Schroeder J.I. (1999) Arabidopsis *abi1-1* and *abi2-1* phosphatase mutations reduce abscisic acid-induced cytoplasmic calcium rises in guard cells. *The Plant Cell* 11, 1785–1798.

Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J. (1990) Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215, 403-10.

Altschul S.F., Madden T.L., Schäffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D.J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25, 3389-402.

An Z., Jing W., Liu Y., Zhang W. (2008) Hydrogen peroxide generated by copper amine oxidase is involved in abscisic acid-induced stomatal closure in *Vicia faba*. *Journal of Experimental Botany* 59, 815–825.

Antognoni F., Casali P., Pistocchi R., Bagni N. (1994) Kinetics and calcium-specificity of polyamine uptake in carrot protoplasts. *Amino Acids* 6, 301-309.

Antunes C., Pereira A.J., Fernandes P., Ramos M., Ascensão L., Correia O., Maguas C. (2018) Understanding plant drought resistance in a mediterranean coastal sand dune ecosystem: Differences between native and exotic invasive species. *Journal of Plant Ecology* 11, 26–38.

Applewhite P. B., Kaur-Sawhney R., Galston A. W. (2010). A role for spermidine in the bolting and flowering of Arabidopsis. *Physiologia Plantarum* 108.

Apse M.P., Aharon G.S., Snedden W.A., Blumwald E. (1999) Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na⁺/H⁺ antiport in Arabidopsis. *Science* 285, 1256-1258.

Atanasov K.E., Barboza-Barquero L., Tiburcio A.F., Alcázar R. (2016) Genome wide association mapping for the tolerance to the polyamine oxidase inhibitor guazatine in *Arabidopsis thaliana*. *Frontiers in Plant Science* 7, 401.

Bartlett J.G., Alves S.C., Smedley M., Snape J.W., Harwood W.A. (2008) High-throughput Agrobacterium-mediated barley transformation. *Plant Methods* 4, 22.

Basu S., Ramegowda V., Kumar A., Pereira A. (2016) Plant adaptation to drought stress. *F1000 Research* 5.

- Beffagna N., Romani G., Sforza M.C. (2000) H⁺ fluxes at plasmalemma level: in vivo evidence for a significant contribution of the Ca²⁺-ATPase and for the involvements of its activity in the abscisic acid-induced changes in *Egeria densa* leaves. *Plant Biology* 2, 168–175.
- Belda-Palazón B., Ruiz L., Martí E., Tárraga S., Tiburcio A.F., Culiáñez F. (2012) Aminopropyltransferases involved in polyamine biosynthesis localize preferentially in the nucleus of plant cells. *PLoS ONE* 7 (10), e46907.
- Bengough A.G., McKenzie B.M., Hallett P.D., Valentine T.A. (2011) Root elongation, water stress, and mechanical impedance: a review of limiting stresses and beneficial root tip traits. *Journal of Experimental Botany* 62, 59–68.
- Berridge M.J., Lipp P., Bootman M.D. (2000) The versatility and universality of calcium signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 1, 11-21.
- Biswas J., Chowdhury B., Bhattacharya A. (2002) In vitro screening for increased drought tolerance in rice. *In Vitro Cellular & Developmental Biology -Plant* 38, 525-530.
- Bitá C.E., Gerats T. (2013) Plant tolerance to high temperature in a changing environment: scientific fundamentals and production of heat stress-tolerant crops. *Frontiers in Plant Science* 4, 273.
- Bittisnich D.J., Entwisle L.O., Neales T.F. (1987) Acid-induced stomatal opening in *Vicia faba* L. and the role of guard cell wall elasticity. *Plant Physiology* 85, 554-557.
- Blatt M.A., Thiel G., Trentham D.M. (1990) Reversible inactivation of K⁺ channels of *Vicia* stomatal guard cells following the photolysis of caged inositol1,4,5-trisphosphate. *Nature* 346,766-769.
- Blum A. (1985) Photosynthesis and transpiration in leaves and ears of wheat and barley varieties. *Journal of Experimental Botany* 36, 432-440.
- Bose J., Pottosin I.I., Shabala S.S., Palmgren M.G., Shabala S. (2011) Calcium efflux systems in stress signaling and adaptation in plants. *Frontiers in Plant Science* 2, 85.
- Bothmer R.Y., Sato K., Komatsuda T., Yasuda S., Fischbeck G. (2003) "Chapter 2: The domestication of cultivated barley" in *Diversity in Barley (Hordeum vulgare)*. *Developments in Plant Genetics and Breeding* 7, 9-27.
- Bouchereau A., Aziz A., Larher F., Martin-Tanguy J. (1999) Polyamines and environmental challenges: recent development. *Plant Science* 140,103–125.
- Bresinsky A., Körner C., Kadereit J. W., Neuhaus G., Sonnewald U. (2008) *Strasburger, Lehrbuch der Botanik*. 36. Auflage.
- Brüggemann L., Pottosin I., Schönknecht G. (1998) Cytoplasmic polyamines block the fast-activating vacuolar cation channel. *The Plant Journal* 16,101 –105.
- Buckley T.N. (2017) Modeling stomatal conductance. *Plant Physiology* 174, 572–582.
- Capell T., Bassie L., Christou P. (2004) Modulation of the polyamine biosynthetic pathway in transgenic rice confers tolerance to drought stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 101, 9909–9914.

- Carteni-Farina M., Porcelli M., Cacciapuoti G., De Rosa M., Gambacorta A., Grant W.D., Ross M.N.M. (1985) Polyamines in halophilic agrobacteria. *FEMS Microbiology Letters* 65, 269-274.
- Case R.M., Eisner D., Gurney A., Jones O., Muallem S., Verkhatsky A. (2007) Evolution of calcium homeostasis: from birth of the first cell to an omnipresent signalling system. *Cell Calcium* 42, 345–350.
- Çavuşoğlu K., Kılıç S., Kabar K. (2007) Effects of pretreatments of some growth regulators on the stomata movements of barley seedlings grown under saline (NaCl) conditions. *Plant, Soil and Environment* 53, 524–528.
- Chaves M.M., Pereira J.S., Maroco J., Rodrigues M.L., Ricarda C.P.P., Osorio M.L., Carvalho I., Faria T., Pinheiro C. (2002) How plants cope with water stress in the field? Photosynthesis and Growth. *Annals of Botany* 89, 907–916.
- Chazen O., Hartung W., Neumann P.M. (1995) The different effects of PEG 6000 and NaCl on leaf development are associated with differential inhibition of root water transport. *Plant, Cell & Environment* 18, 727-735.
- Chen Z., Gallie D.R. (2004) The ascorbic acid redox state controls guard cell signaling and stomatal movement. *The Plant Cell* 16, 1143-1162.
- Chen B.X., Li W.-Y., Gao Y.-T., Chen Z.-J, Zhang W.-N., Liu Q.-J., Chen Z. (2016) Involvement of polyamine oxidase-produced hydrogen peroxide during coleorhiza-limited germination of rice seeds. *Frontiers in Plant Science* 7, 1219.
- Ciais P., Reichstein M., Viovy N. (2005) Europe-wide reduction in primary productivity caused by the heat and drought in 2003. *Nature* 437, 529–533.
- Clay N.K., Nelson T. (2005) Arabidopsis thickvein mutation affects vein thickness and organ vascularization, and resides in a provascular cell-specific spermine synthase involved in vein definition and in polar auxin transport. *Plant Physiology* 138,767–777.
- Clayton H., Knight M.R., Knight H., McAinsh M.R., Hetherington A.M. (1999) Dissection of the ozone-induced calcium signature. *The Plant Journal* 17, 575–579.
- Cogo A.J.D., Ferreira K.d.R.D., Okorokov L.A., Ramos A.C., Façanha A.R., Okorokova-Façanha A.L. (2018) Spermine modulates fungal morphogenesis and activates plasma membrane H⁺-ATPase during yeast to hyphae transition. *The Company of Biologists Ltd | Biology Open* 7.
- Cona A., Rea G., Angelini R., Federico R., Tavladoraki P. (2006) Function of amine oxidases in plant development and defence. *Trends in Plant Science* 11, 80–88.
- Conn S.J., Gilliam M., Athman A. (2011) Cell-specific vacuolar calcium storage mediated by CAX1 regulates apoplastic calcium concentration, gas exchange, and plant productivity in Arabidopsis. *The Plant Cell* 23, 240–257.
- Corpet F. (1988) Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Research* 16, 10881-10890.
- Davenport R. (2002) Glutamate receptors in plants. *Annals of Botany* 90, 549-557.
- Davey M.R., Kothari S.L., Zhang H., Rech E.L., Cocking E.C., Lynch P.T. (1991) Transgenic rice: characterization of protoplast-derived plants and their seed progeny. *Journal of Experimental Botany* 42, 1159-1169.

- Deikman J., Petracek M., Heard J.E. (2012) Drought tolerance through biotechnology: Improving translation from the laboratory to farmers' fields. *Current Opinion in Biotechnology*, 23, 243–250.
- Deinlein U., Stephan A.B., Horie T., Luo W., Xu G.H., Schroeder J.I. (2014). Plant salt tolerance mechanisms. *Trends in Plant Science* 19, 371-379.
- Desikan R., Cheung M., Bright J., Hancock J.T., Neill S.J. (2004) ABA, hydrogen peroxide and nitric oxide signalling in stomatal guard cells. *Journal of Experimental Botany* 55, 205–212.
- Do, Thi P., Degenkolbe T., Erban A., Heyer A.G., Kopka J., Köhl K.I., Hinch D.K., Zuther E. (2013) Dissecting rice polyamine metabolism under controlled long-term drought stress. *PLOS one* 8.
- Dobrovinskaya O.R., Muñoz J., Pottosin I.I. (1999) Inhibition of vacuolar ion channels by polyamines. *Journal of Membrane Biology* 167, 127–140.
- Dodd A.N., Jakobsen M.K., Baker A.J., Telzerow A., Hou S.-W., Laplaze L., Barrot L., Poethig R.S., Haseloff J., Webb A.A.R. (2006) Time of day modulates low-temperature Ca^{2+} signals in Arabidopsis. *The Plant Journal* 48, 962–973.
- Dodd A.N., Kudla J., Sanders D. (2010) The language of calcium signaling. *Annual Review of Plant Biology* 61, 593–620.
- Dreassi E., Zizzari A.T., D'Arezzo S., Visca P., Botta M. (2007) Analysis of guazatine mixture by LC and LC-MS and antimycotic activity determination of principal components. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 43, 1499–1506.
- Dreyer I., Uozumi N. (2011) Potassium channels in plant cells. *The FEBS Journal* 278, 4293-4303.
- Dutra N.T., Silveira V., de Azevedo I.G., Gomes-Neto L.R., Façanha A.R., Steiner N., Guerra M.P., Floh E.I.S., Santa-Catarina C. (2013) Polyamines affect the cellular growth and structure of pro-embryogenic masses in *Araucaria angustifolia* embryogenic cultures through the modulation of proton pump activities and endogenous levels of polyamines. *Physiologia Plantarum* 148, 121-132.
- Evans M.J., Choi W-G., Gilroy S., Morris R.J. (2006) A ROS-assisted calcium wave dependent on the AtRBOHD NADPH oxidase and TPC1 cation channel propagates the systemic response to salt stress. *Plant Physiology* 171, 1771–1784.
- Falquet L., Pagni M., Bucher P., Hulo N., Sigrist C.J.A., Hofmann K., Bairoch A. (2002) ExPasy molecular biology server. *Swiss Institute of Bioinformatics, Nucleic Acids Research* 30, 235–238.
- FAO (2018) <http://www.fao.org/statistics/en/>
- Franks P.J., Buckley T.N., Shope J.C., Mott K.A. (2001) Guard cell volume and pressure measured concurrently by confocal microscopy and the cell pressure probe. *Plant Physiology* 125, 1577–1594.
- Franks P.J., Cowan I.R., Farquhar G.D. (1998) a study of stomatal mechanics using the cell pressure probe. *Plant Cell Environment* 21, 94–100.
- Frey W., Lösch R. (2010) *Geobotanik Pflanze und Vegetation in Raum und Zeit*. Spektrum Akademischer Verlag.

Fridovich I. (1997) Superoxide anion radical ($O_2^{\cdot-}$), superoxide dismutases and related matters. *The Journal of Biological Chemistry* 272, 18515-18517.

Fu X.Z., Xing F., Wang N.Q., Peng L.Z., Chun C.P., Cao L. (2014) Exogenous spermine pretreatment confers tolerance to combined high-temperature and drought stress in vitro in trifoliolate orange seedlings via modulation of antioxidative capacity and expression of stress-related genes. *Biotechnology, Biotechnological Equipment* 28, 192–198.

Garcia-Moreno B. (2009) Adaptations of proteins to cellular and subcellular pH. *Journal of Biology* 8, 98.

Garufi A., Visconti S., Camoni L., Aducci P. (2007) Polyamines as physiological regulators of 14-3-3 interaction with the plant plasma membrane H^+ -ATPase. *Plant and Cell Physiology* 48, 434–440.

Geilfus C.-M. (2017) The pH of the apoplast: dynamic factor with functional impact under stress. *Molecular Plant* 10, 1371-1386.

Geneste H., Hesse M. (1998) Polyamine und Polyamin-Derivate in der Natur. *Organische Chemie* 32, 206–221.

Gill S.S., Tuteja N. (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 48, 909–930.

Gilroy S., Read N.D., Trewavas A.J. (1990) Elevation of cytoplasmic calcium by caged calcium or caged inositol trisphosphate initiates stomatal closure. *Nature* 343, 769-771.

Gilroy S., Białasek M., Suzuki N., Górecka M., Devireddy A.R., Karpiński S., Mittler R. (2016) ROS, calcium, and electric signals: key mediators of rapid systemic signaling in plants. *Plant Physiology* 171, 1606–1615.

Gonzalez M.E., Marco F., Minguet E.G., Carrasco-Sorli P., Blazquez M.A., Carbonell J. (2011) Perturbation of spermine synthase gene expression and transcript profiling provide new insights on the role of the tetraamine spermine in *Arabidopsis* defense against *Pseudomonas viridiflava*. *Plant Physiology* 156, 2266–2277.

Groppa M., Benavides M. (2008) Polyamines and abiotic stress: recent advances. *Amino Acids* 34, 35-45.

Guan L.M., Zhao J., Scandalios J.G. (2000) Cis-elements and trans-factors that regulate expression of the maize *Cat1* antioxidant gene in response to ABA and osmotic stress: H_2O_2 is the likely intermediary signaling molecule for the response. *Plant Journal* 22, 87–95.

Ghughe S. A., Tisi A., Carucci A., Rodrigues-Pousada R. A., Franchi S., Tavladoraki P. (2015) Cell wall amine oxidases: new players in root xylem differentiation under stress conditions. *Plants* 4, 489–504.

Ha H.C., Sirisoma N.S., Kuppusamy P., Zweier J.L., Woster P.M., Casero R.A. Jr. (1998) The natural polyamine spermine functions directly as a free radical scavenger. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 11140–11145.

Habte E., Muller L.M., Shtaya M., Davis S.J., Von Korff M. (2014) Osmotic stress at the barley root affects expression of circadian clock genes in the shoot. *Plant Cell Environment* 37, 1321–1327.

- Hamana K., Hayashi H., Niitsu M., Itoh T. (2009) Polyamine analysis of thermophilic, acidophilic, alkaliphilic and radio-tolerant bacteria belonging to the domain Bacteria and methanogens, thermophiles and extreme halophiles belonging to the domain Archaea - Polyamine catalogues of bacterial (eubacterial) and archaeal (archaeobacterial) extremophiles IV. *Journal of Japanese Society for Extremophiles* 8, 59-68.
- Hamana K., Matsuzaki S. (1987) Distribution of polyamines in actinomycetes. *FEMS Microbiology Letters* 41, 211-215.
- Hamana K., Matsuzaki S., Niitsu M., Samejima K. (1989) Polyamine distribution and the potential to form novel polyamines in phytopathogenic agrobacteria. *FEMS Microbiological Letters* 65, 269-274.
- Hamana K., Matsuzaki S., Niitsu M., Samejima K. (1990). Synthesis of novel polyamines in paracoccus, rhodobacter and micrococcus. *FEMS Microbiological Letters* 67, 267-274.
- Hamasaki-Katagiri N., Katagiri Y., Tabor C.W., Tabor H. (1998) Spermine is not essential for growth of *Saccharomyces cerevisiae*: identification of the SPE4 gene (spermine synthase) and characterization of a spe4 deletion mutant. *Gene* 210, 195–201.
- Hamilton D.W.A., Hills A., Kohler B., Blatt M.R. (2000) Ca²⁺ channels at the plasma membrane of stomatal guard cells are activated by hyperpolarization and abscisic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 97, 4967–4972.
- Hanfrey C., Sommer S., Mayer M.J., Burtin D., Michael A.J. (2001) Arabidopsis polyamine biosynthesis: absence of ornithine decarboxylase and the mechanism of arginine decarboxylase activity. *Plant Journal* 27, 551–560.
- Hanzawa Y., Imai A., Michael A.J., Komeda Y., Takahashi T. (2002) Characterization of the spermidine synthase-related gene family in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters* 527, 176–180.
- Hanzawa Y., Takahashi T., Komeda Y. (1997) ACL5: an *Arabidopsis* gene required for internodal elongation after flowering. *Plant Journal* 12, 863–874.
- Hanzawa Y., Takahashi T., Michael A.J. (2000) ACAULIS5, an *Arabidopsis* gene required for stem elongation, encodes a spermine synthase. *EMBO Journal* 19, 4248–4256.
- Hanzawa Y., Imai A., Michael A.J., Komeda Y., Takahashi T. (2002) Characterization of the spermidine synthase-related gene family in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters* 527, 179-180.
- Hartung W. (1983) Die intrazelluläre Verteilung von Phytohormonen in Pflanzenzellen. *Hahenheimer Arbeiten* 129, 64-80.
- Harwood W.A., Bartlett J.G., Alves S.C., Perry M., Smedley M.A., Leyland N., Snape J.W. (2009) Barley transformation using *Agrobacterium*-mediated techniques. *Methods in Molecular Biology* 478, 137-147.
- Hensel G., Valkov V., Middlefell-Williams J., Kumlehn J. (2008) Efficient generation of transgenic barley: the way forward to modulate plant-microbe interactions. *Journal of Plant Physiology* 165, 71-82.

- Hohl M., Schopfer P. (1991) Water relations growing maize coleoptiles. Comparison between mannitol and polyethylene glycol 6000 as external osmotica for adjusting turgor pressure. *Plant Physiology* 95, 716-722.
- Hosoya R., Hamana K. (2004) Distribution of two triamines, spermidine and homospermidine, and an aromatic amine, 2-phenylethylamine, within the phylum Bacteroidetes. *The Journal of General and Applied Microbiology* 50, 255-260.
- Hussain S.S., Ali M., Ahmad M., Siddique K.H. (2011) Polyamines: natural and engineered abiotic and biotic stress tolerance in plants. *Biotechnology Advances* 29, 300-311.
- Hussain H.A., Hussain A., Khaliq A., Ashraf U., Anjum S.A., Men S., Wang L. (2018) Chilling and drought stresses in crop plants: implications, cross talk, and potential management opportunities. *Frontiers of Plant Science* 9, 393.
- Ikeguchi Y., Bewley M.C., Pegg A.E. (2006) Aminopropyltransferases: function, structure and genetics. *The Journal of Biochemistry* 139, 1-9.
- Ikeguchi Y., Bewley M.C., Pegg A.E. (2006) Aminopropyltransferases: function, structure and genetics. *Journal of Biochemistry* 139, 1-9.
- Imai A., Akiyama T., Kato T. (2004b) Spermine is not essential for survival of Arabidopsis. *FEBS Letters* 556, 148-152.
- Imai A., Matsuyama T., Hanzawa Y. (2004a) Spermidine synthase genes are essential for survival of Arabidopsis. *Plant Physiology* 135, 1565-1573.
- Inoue S., Takemiya A., Shimazaki K. (2010) Phototropin signaling and stomatal opening as a model case. *Current Opinion in Plant Biology* 13, 587-593.
- Inoue S.I., Kinoshita T. (2017) Blue light regulation of stomatal opening and the plasma membrane H⁺-ATPase. *Plant Physiology* 174, 531-538.
- Irving H.R., Gehring C.A., Parish R.W. (1992) Changes in cytosolic pH and calcium of guard cells precede stomatal movements. *Plant Biology* 89, 1790-1794.
- Jarzyński K.M., Jasiński M. (2014) Membrane transporters and drought resistance – a complex issue. *Frontiers in Plant Science* 5, 687.
- Jinno N., Kuraishi S. (1982) Acid-induced stomatal opening in *Commelina communis* and *Vicia faba*. *Plant Cell Physiology* 23, 1169-1174.
- Takeuchi J., Kuwashiro Y., Niitsu M., Takahashi T. (2008) Thermospermine is required for stem elongation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiology* 49, 1342-1349.
- Kakkar R. K., Sawhney V. K. (2002) Polyamine research in plants - a changing perspective. *Journal of Plant Physiology* 116, 281-292.
- Kar R.K. (2011) Plant responses to water stress: Role of reactive oxygen species. *Plant Signalling Behavior* 6, 1741-1745.
- Katz A.M., Tolokh I.S., Pabit Z.A., Baker N., Onufriev A.V., Pollack L. (2017) Spermine condenses DNA, but not RNA duplexes. *Biophys J.* 112, 22-30.
- Kaur-Sawhney R., Flores H.E., Galston A.W. (1981) Polyamine oxidase in oat leaves: a cell wall-localized enzyme. *Plant Physiology* 68, 494-498.

- Keller T., Damude H.G., Werner D., Doerner P., Dixon R.A., Lamb C. (1998) A plant homolog of the neutrophil NADPH oxidase gp91phox subunit gene encodes a plasma membrane protein with Ca²⁺ binding motifs. *Plant Cell* 10, 255-66.
- Kelley K.B., Reichers D.E. (2007) Recent developments in auxin biology and new opportunities for auxin herbicide research. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 89, 1–11.
- Khan N. (2017) Polyamines and calcium signalling in drought tolerance of Arabidopsis and Barley. urn:nbn:de:gbv:3:4-21206
- Kiegle E., Moore C.A., Haseloff J., Tester M.A., Knight M.R. (2000) Cell-type-specific calcium responses to drought, salt and cold in the Arabidopsis root. *The Plant Journal* 23, 267-278.
- Kiep V., Vadassery J., Lattke J., Maaß J.-P., Boland W., Peiter E. (2015) Systemic cytosolic Ca²⁺ elevation is activated upon wounding and herbivory in Arabidopsis. *New Phytologist* 207, 996–1004.
- Knight H., Trewavas A.J., Knight M.R. (1997) Calcium signalling in Arabidopsis thaliana responding to drought and salinity. *The Plant Journal* 12, 1067-1078.
- Knight M.R., Campbell A.K., Smith S.M., Trewavas A.J. (1991) Transgenic plant aequorin reports the effects of touch and cold-shock and elicitors on cytoplasmic calcium. *Nature* 352, 524-526.
- Knight H., Trewavas A.J., Knight M.R. (1996) Cold calcium signaling in Arabidopsis involves two cellular pools and a change in calcium signature after acclimation. *The Plant Cell* 8, 489-503.
- Knott J.M., Römer P., Sumper M. (2007) Putative spermine synthases from *Thalassiosira pseudonana* and *Arabidopsis thaliana* synthesize thermospermine rather than spermine. *FEBS Letters* 581, 3081–3086.
- Kudla J., Batistic O., Hashimoto K. (2010) Calcium signals: the lead currency of plant information processing. *The Plant Cell* 22, 541–563.
- Kukavica B., Mojović M., Ž. Vučinić Z., Maksimović V., Takahama U., Jovanović S.V. (2009) Generation of hydroxyl radical in isolated pea root cell wall, and the role of cell wall-bound peroxidase, Mn-SOD and phenolics in their production. *Plant and Cell Physiology* 50, 304–317.
- Kusano T., Berberich T., Tateda C., Takahashi Y. (2008) Polyamines: essential factors for growth and survival. *Planta* 228, 367–381.
- Kusano T., Yamaguchi K., Berberich T., Takahashi Y. (2007a) Advances in polyamine research in 2007. *Journal of Plant Research* 120, 345–350.
- Kusano T., Yamaguchi K., Berberich T., Takahashi Y. (2007b) The polyamine spermine rescues Arabidopsis from salinity and drought stresses. *Plant Signaling & Behavior* 2, 250–251.
- Kusano T., Suzuki H. (2015) Polyamines a universal molecular nexus for growth, survival, and specialized metabolism. Springer-Verlag, 1. Auflage

- Kwaaitaal M., Huisman R., Maintz J., Reinstadler A., Panstruga R. (2011) Ionotropic glutamate receptor (iGluR)-like channels mediate MAMP-induced calcium influx in *Arabidopsis thaliana*. *Biochemical Journal* 440, 355–365.
- Kwak J.M., Mori I.C., Pei Z.M., Leonhardt N., Torres M.A., Dangl J.L., Bloom R.E., Bodde S., Jones J.D.G., Schroeder J.I. (2003) NADPH oxidase *AtrbohD* and *AtrbohF* genes function in ROS-dependent ABA signaling in *Arabidopsis*. *EMBO Journal* 22, 2623–2633.
- Landi S., Capasso G., Ezzahra F., Azaiez B., Jallouli S., Ayadi S., Trifa Y., Esposito S. (2019) Different roles of heat shock proteins (70 kDa) during abiotic stresses in barley (*Hordeum vulgare*) genotypes. *Plants*, 8, 248. Lebaudy A., Hosy E., Simonneau T., Sentenac H., Thibaud J.B., Dreyer I. (2008) Heteromeric K⁺ channels in plants. *Plant Journal* 54, 1076–1082.
- Leegood R.C. (2013) Strategies for engineering C₄ photosynthesis. *Journal of Plant Physiology* 170, 378-388.
- Lemaux P.G., Cho M.-J., Zhang S., Bregitzer P. (1999) Transgenic cereals: *Hordeum vulgare* L. (barley). In: Vasil I.K. (ed) *Molecular improvement of cereal crops*. Kluwer, Dordrecht, 255–316.
- Leprince O., Hendry G.A.F., McKersie B.D. (1993) The mechanisms of desiccation tolerance in developing seeds. *Seed Science Research* 3, 231–246.
- Levitt J. (1980) *Responses of plants to environmental stress*, 2nd edition, volume 1: chilling, freezing, and high temperature stresses.
- Li B., Guo S., Sun J., Ai E. (2011) Effects of exogenous spermidine on free polyamine content and polyamine biosynthesis gene expression in cucumber seedlings under salt Stress. *Plant Science Journal* 29, 480–485.
- Liu H.P., Dong B.H., Zhang Y.Y., Liu Z.P., Liu Y.L. (2004) Relationship between osmotic stress and the levels of free, conjugated, and bound polyamines in leaves of wheat seedlings. *Plant Science* 166, 1261–1267.
- Liu J.H., Wang W., Wu H., Gong X., Moriguchi T. (2015) Polyamines function in stress tolerance: from synthesis to regulation. *Frontiers in Plant Sciences* 6, 827.
- Liu K., Fu H., Bei Q., Luan S. (2000) Inward potassium channel in guard cells as a target for polyamine regulation of stomatal movements. *Plant Physiology* 124, 1315–1326.
- Liu Y., Gu D., Wu W., Ai E. (2013) The relationship between polyamines and hormones in the regulation of wheat grain filling. *PLOS one* 8, e7819
- Lüttge U, (2010) Ability of crassulacean acid metabolism plants to overcome interacting stresses in tropical environments. *AoB PLANTS* 005.
- Maathuis F.J.M. (2009) Physiological functions of mineral macronutrients. *Current Opinion in Plant Biology* 12, 250-258.
- Maathuis F.J.M., Ahmad I., Patishtan J. (2014) Regulation of Na⁺ fluxes in plants. *Frontiers in Plant Science* 5.
- Magrin G.O, Hall A.J., Castellano S., Meira S.G. (1991) Rooting depth, growth cycle duration, and timing of the jointing stage in wheat: traits that can contribute to early

droughttolerance In: D.A. Saunders (ed.) *Wheat for The Nontraditional Warm Areas*. CIMMYT Mexico, 509-515.

Malho R., Moutinho A., van der Luit A., Trewawas A.J. (1998) Spatial characteristics of calcium signaling: The calcium wave as a basic unit in plant cell calcium signaling. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 353, 1463-1473.

Marten I., Deeken R., Hedrich R., Roelfsema M.R. (2010) Light-induced modification of plant plasma membrane ion transport. *Plant Biology* 12, 64–79.

Martin-Tanguy J. (2001) Metabolism and function of polyamines in plants: recent development (new approaches). *Plant Growth Regulation* 34, 135–148.

Matthews P.R., Wang M.B., Waterhouse P.M., Thornton S., Fieg S.J., Gubler F., Jacobsen J.V. (2001) Marker gene elimination from transgenic barley, using co-transformation with adjacent 'twin T-DNAs' on a standard *Agrobacterium* transformation vector. *Molecular Breeding* 7, 195–202.

McAinsh M.R., Hetherington A.M. (1998) Encoding specificity in Ca^{2+} signalling systems. *Trends in Plant Science* 3, 32–36.

McAinsh M.R., Brownlee C., Hetherington A.M. (1990) Abscisic acid-induced elevation of guard cell Ca^{2+} precedes stomatal closure. *Nature* 343, 186-188.

McAinsh M.R., Clayton H., Mansfield T.A., Hetherington A.M. (1996) Changes in stomatal behavior and guard cell cytosolic free calcium in response to oxidative stress. *Plant Physiology* 111, 1031–1042.

McAinsh M.R., Pittman J.K. (2009) Shaping the calcium signature. *New Phytologist* 181, 275–294.

Medvedev S.S. (2018) Principles of calcium signal generation and transduction in plant cells. *Russian Journal of Plant Physiology* 65, 771–783.

Michael B., Kaufmann M.R. (1973) The osmotic potential of polyethylene glycol 6000. *Plant Physiology* 69, 1145-1149.

Mitsuya Y., Takahashi Y., Berberich T., Miyazaki A., Matsumura H., Takahashi H. (2009) Spermine plays a significant role in the defense response of *Arabidopsis thaliana* to cucumber mosaic virus. *Journal of Plant Physiology* 166, 626–643.

Monteith J.L., Elston J. (1996) Climatic constraints on crop production. In: L. Fowden, T. Mansfield, Stoddart J. (eds.) *Plant Adaptation to Environmental Stress*, 3-18.

Moschou P.N., Paschalidis K.A., Delis I.D., Andriopoulou A.H., Lagiotis G.D., Yakoumakis D.I. (2008) Spermidine exodus and oxidation in the apoplast induced by abiotic stress is responsible for H_2O_2 signatures that direct tolerance responses in tobacco. *Plant Cell* 20, 1708–1724.

Moschou P.N., Sarris P.F., Skandalis N., Andriopoulou A.H., Paschalidis K.A., Panopoulos N.J., Roubelakis-Angelakis K.A. (2009) Engineered polyamine catabolism preinduces tolerance of tobacco to bacteria and oomycetes. *Plant Physiology* 149, 1970–1981.

Moschou P.N., Wu J., Cona A., Tavladoraki P., Angelini R., Roubelakis-Angelakis K.A. (2012) The polyamines and their catabolic products are significant players in the turnover of nitrogenous molecules in plants. *Journal of Experimental Botany* 63, 5003–5015.

- Moyen C., Hammond-Kosack K.E., Jones, J., Knight M.R., Johannes E. (1998) Systemin triggers an increase in cytoplasmic calcium in tomato mesophyll cells: Ca²⁺ mobilization from intra- and extracellular compartments. *Plant Cell & Environment* 21, 1101–1111.
- Muller B., Pantin F., Génard M., Turc O., Freixes S., Piques M., Gibon Y. (2011) Water deficits uncouple growth from photosynthesis, increase C content, and modify the relationships between C and growth in sink organs. *Journal of Experimental Botany* 62, 1715–1729.
- Munné-Bosch S., Alegre L. (2004) Die and let live: leaf senescence contributes to plant survival under drought stress. *Functional Plant Biology* 31, 203–216.
- Munns R. (1993) Physiological processes limiting plant growth in saline soil: some dogmas and hypotheses. *Plant Cell & Environment* 16, 15–24.
- Munns R., Tester M. (2008) Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review of Plant Biology* 59, 651–681.
- Murata Y., Pei Z.-M., Mori I.C., Schroeder J.I. (2001) Abscisic acid activation of plasma membrane Ca²⁺ channels in guard cells requires cytosolic NAD(P)H and is differentially disrupted upstream and downstream of reactive oxygen species production in *abi1-1* and *abi2-1* protein phosphatase 2C mutants. *Plant Cell* 13, 2513–2523.
- Murray F., Brettell R., Matthews P., Bishop D., Jacobsen J. (2004) Comparison of *Agrobacterium*-mediated transformation of four barley cultivars using the GFP and GUS reporter genes. *Plant Cell Reports* 22, 397–402.
- Nagai T., Yamada S., Tominaga T., Ichikawa M., Miyawaki A. (2004) Expanded dynamic range of fluorescent indicators for Ca²⁺ by circularly permuted yellow fluorescent proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 101(29), 10554–10559.
- Nahar K., Hasanuzzaman M., Alam M. M., Rahman A., Mahmud J.-A., Suzuki T., et al. (2016) Insights into spermine-induced combined high temperature and drought tolerance in mung bean: osmoregulation and roles of antioxidant and glyoxalase system. *Protoplasma* 254, 445–460.
- Naka Y., Watanabe K., Sagor G.H.M., Niitsu M., Pillai A., Kusano T. (2010) Quantitative analysis of plant polyamines including thermospermine during growth and salinity stress. *Plant Physiology and Biochemistry* 48, 527–533.
- Nickerson K.W., Dunkle L.D., Van Etten J.L. (1977) Absence of spermine in filamentous fungi. *Journal of Bacteriology* 129, 173–176.
- Nürnberg T., Nennstiel D., Jabs T., Sacks W., Hahlbrock K., Scheel D. (1994) High affinity binding of a fungal oligopeptide elicitor to parsley plasma membranes triggers multiple defence responses. *Cell* 78: 449–460.
- Oshima T. (1979) Molecular basis for unusual thermostabilities of cell constituents from an extreme thermophile, *Thermus thermophilus*. In M Shilo, ed, *Strategies of Microbial Life in Extreme Environments*. Dahlem Konferenzen, Berlin, 455–469.
- Osmolovskaya N., Shumilina J., Kim A., Didio A., Grishina T., Bilova T., Keltsieva O.A., Zhukov V., Tikhonovich I., Tarakhovskaya E., Frolov A., Wessjohann L.A. (2018) Methodology of drought stress research: experimental setup and physiological characterization. *International Journal of Molecular Sciences* 19, 4089.

- Pandey G.K. (2017) Mechanism of plant hormone signaling under stress, first edition, volume 2.
- Pandey G.K., Cheong Y.H., Kim B.G., Grant J.J., Li L., Luan S. (2007) CIPK9: a calcium sensor-interacting protein kinase required for low-potassium tolerance in Arabidopsis. *Cell Research*, 17, 411-421.
- Pandolfi C., Pottosin I., Cuin T., Mancuso S., Shabala S. (2010) Specificity of polyamine effects on NaCl-induced ion flux kinetics and salt stress amelioration in plants. *Plant Cell Physiology* 51, 422-434.
- Panicot M., Minguet E.G., Ferrando A. (2002) A polyamine metabolon involving aminopropyl transferases complexes in Arabidopsis. *Plant Cell* 14, 2539–2551.
- Papadakis A.K., Roubelakis-Angelakis K.A. (2005) Polyamines inhibit NADPH oxidase-mediated superoxide generation and putrescine prevents programmed cell death induced by polyamine oxidase-generated hydrogen peroxide. *Planta* 220, 826-37.
- Parry M.L., Rosenzweig C., Iglesias A., (1999) Climate change and world food security: a new assessment. *Global Environmental Change* 9, 51–67.
- Pegg A.E. (2009) Mammalian polyamine metabolism and function. *IUBMB Life*. 61, 880–894.
- Pegg A.E., Michael A.J. (2010) Spermine synthase. *Cellular and Molecular Life Sciences* 67,113-121.
- Pegg A.E. (2013) Toxicity of polyamines and their metabolic products. *Chemical Research in Toxicology*, 26, 1782–1800.
- Pei Z.-M., Murata Y., Benning G., Thomine S., Klusener B., Allen G.J., Grill E., Schroeder J.I. (2000) Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signalling in guard cells. *Nature* 406, 731–734.
- Peiter E. (2011) The plant vacuole: emitter and receiver of calcium signals. *Cell Calcium* 50, 120-128.
- Peiter E., Maathuis F.J.M., Mills L.N., Knight H., Pelloux J., Hetherington A.M., Sanders D. (2005) The vacuolar Ca²⁺-activated channel TPC1 regulates germination and stomatal movement. *Nature* 434, 404-408.
- Pietack S. (2019) Einfluss von Trockenstress auf Polyamine und Sperminsynthesen in Gerste (*Hordeum vulgare*). <http://dx.doi.org/10.25673/13876>
- Pistocchi R., Keller F., Bagni N., Matile P. (1998) Transport and subcellular localization of polyamines in carrot protoplasts and vacuoles. *Plant Physiology* 87, 514-518.
- Platt A.R., Woodhall R.W., George A.L. (2007) Improved DNA sequencing quality and efficiency using an optimized fast cycle sequencing protocol. *BioTechniques* 43, 58.
- Price A.H., Taylor S., Ripley S.J., Griffiths A., Trewavas A.J., Knight M.R. (1994) Oxidative signals in tobacco increase cytosolic calcium. *Plant Cell* 6, 1301–1310.
- Pottosin I., Shabala S. (2014) Polyamines control of cation transport across plant membranes: implications for ion homeostasis and abiotic stress signaling. *Frontiers in Plant Science* 5, 154.

- Rangan P., Subramani R., Kumar R., Singh A.K., Singh R. (2014) Recent advances in polyamine metabolism and abiotic stress tolerance. *BioMed Research International* Volume 2014, Article ID 239621.
- Rentel M.C., Knight M.R. (2004) Oxidative stress-induced calcium signaling in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 135, 1471–1479.
- Rhodes C.A., Pierce D.A., Mettler I.J., Mascarenhas D., Detmer J.J. (1988) Genetically transformed maize plants from protoplasts. *Science* 240, 204-207.
- Rodríguez-Kessler M., Delgado-Sánchez P., Rodríguez-Kessler G.T., Moriguchi T., Jiménez-Bremont J.F. (2010) Genomic organization of plant aminopropyl transferases. *Plant Physiology and Biochemistry* 48, 1-17.
- Roelfsema M.R.G., Hedrich R. (2008) Studying guard cells in the intact plant: modulation of stomatal movement by apoplastic factors. *New Phytologist* 153, 3.
- Romero-Puertas M.C., Rodríguez-Serrano M., Sandalio L.M. (2013), Protein S-nitrosylation in plants under abiotic stress: an overview. *Frontiers in Plant Science* 4, 373
- Roy M., Wu R. (2002) Overexpression of S-adenosylmethionine decarboxylase gene in rice increases polyamine level and enhances sodium chloride-stress tolerance. *Plant Science* 163, 987–992.
- Rozen S., Skaletsky H. (2000) Primer3 on the www for general users and for biologist programmers. *Methods in Molecular Biology* 132, 365–386.
- Sagor G.H.M., Yamaguchi K., Watanabe K., Berberich T., Kusano T., Takahashi Y. (2011) Spatio-temporal expression analysis of *Arabidopsis thaliana* spermine synthase gene promoter. *Plant Biotechnology* 28, 407–411.
- Sagor G.H.M., Chawla P., Kim D.W., Berberich T., Kojima S., Niitsu M., Kusano T. (2015) The polyamine spermine induces the unfolded protein response via the MAPK cascade in *Arabidopsis*. *Frontiers in Plant Science* 6, 687.
- Sanders D., Pelloux J., Brownlee C., Harper J.F. (2002) Calcium at the crossroads of signaling. *The Plant Cell* 14 (Suppl.), 401–417.
- Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 74(12), 5463–5467.
- Schroeder J.I., Allen G.J., Hugouvieux V., Kwak J.M., Waner D. (2001a) Guard Cell Signal Transduction. *Annual review of plant physiology and plant molecular biology* 52, 627-658.
- Schroeder J.I., Kwak J.M., Allen G.J. (2001b) Guard cell abscisic acid signalling and engineering drought hardiness in plants. *Nature* 410, 327-330.
- Schwartz A. (1985) Role of Ca^{2+} and EGTA on stomatal movements in *Commelina communis*. L. *Plant Physiology* 79, 1003-1005.
- Sedbrook J.C., Kronebusch P.J., Borisy G.G., Trewavas A.J., Masson P.H. (1996) Transgenic AEQUORIN reveals organ-specific cytosolic Ca^{2+} responses to anoxia and *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant Physiology* 111, 243–257.

- Seifi H.S., Shelp B.J. (2019) Spermine differentially refines plant defense responses against biotic and abiotic stresses. *Frontiers in Plant Science* 10, 117.
- Shahenshah, Isoda A. (2010) Effects of water stress on leaf temperature and chlorophyll fluorescence parameters in cotton and peanut. *Plant Production Science* 13, 269-278.
- Sharp R.E., Davies W.J. (1985) Root growth and water uptake by maize plants in dry soil. *Journal of Experimental Botany* 36, 1441-1456.
- She X.P., Song X.G., He J.M. (2004) Role and relationship of nitric oxide and hydrogen peroxide in light/dark-regulated stomatal movement in *Vicia faba*. *Acta Botanica Sinica* 46, 1292–1300.
- Shen L., Gong J., Caldo R.A., Nettleton D., Cook D., Wise R.P., Dickerson J.A. (2005) Barley Base—an expression-profiling database for plant genomics. *Nucleic Acids Research* 33, 614–618.
- Shi H.Z., Ishitani M., Kim C.S., Zhu J.K. (2000) The *Arabidopsis thaliana* salt tolerance gene *SOS1* encodes a putative Na^+/H^+ antiporter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 6896-6901.
- Shimazaki K., Doi M., Assmann S.M., Kinoshita T. (2007) Light regulation of stomatal movement. *Annual Review Plant Biology* 58, 219–247.
- Shrawat A.K., Becker D., Lorz H. (2007) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Science* 172, 281–290.
- Slovik S., Daeter W., Hartung W. (1995) Compartmental redistribution and long-distance transport of abscisic acid (ABA) in plants as influenced by environmental changes in the rhizosphere — a biomathematical model. *Journal of Experimental Botany* 46, 881-894.
- Smirnoff N., Wheeler G.L. (2000) Ascorbic acid in plants: biosynthesis and function. *Critical Reviews in Plant Science* 19, 267-290.
- Stäb M.R., Ebel J. (1987) Effects of Ca^{2+} on phytoalexin induction by fungal elicitor in soybean cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 257, 416–423.
- Staxén I., Pical C., Montgomery L.T., Gray J.E., Hetherington A.M., McAinsh M.R. (1999) Abscisic acid induces oscillations in guard-cell cytosolic free calcium that involve phosphoinositide-specific phospholipase C. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 96, 1779–1784.
- Sutter J.U., Sieben C., Hartel A., Eisenach C., Thiel G., Blatt M.R. (2007) Abscisic acid triggers the endocytosis of the *Arabidopsis* KAT1 K^+ channel and its recycling to the plasma membrane. *Current Biology* 17, 1396–1402.
- Sobieszczuk-Nowicka E. (2017). Polyamine catabolism adds fuel to leaf senescence. *Amino Acids* 49, 49–56.
- Sze H., Liang F., Hwang I., Curran A.C., Harper J.F. (2000) Diversity and regulation of plant Ca^{2+} pumps: insights from expression in yeast. *Annual Review in Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 51, 433-62.
- Szira F., Bálint A.F., Börner A., Galiba G. (2008) Evaluation of drought-related traits and screening methods at different developmental stages in spring barley. *Journal of Agronomy and Crop Science* 194, 334–342.

- Takahashi Y., Ebisu Y., Kinoshita T., Doi M., Okuma E., Murata Y., Shimazaki K. (2013) bHLH transcription factors that facilitate K⁺ uptake during stomatal opening are repressed by abscisic acid through phosphorylation. *Science Signaling* 6, 48.
- Takahashi Y., Kinoshita T., Matsumoto M., Shimazaki K. (2016) Inhibition of the Arabidopsis bHLH transcription factor by monomerization through abscisic acid-induced phosphorylation. *The Plant Journal* 87, 559–567.
- Takahashi Y., Tahara M., Yamada Y., Ai E. (2017b). Characterization of the polyamine biosynthetic pathways and salt stress response in *Brachypodium distachyon*. *Journal of Plant Growth Regul.* 37, 625–634.
- Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S. (2011) MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* 28, 2731–2739.
- Tao Y., Wang J., Miao J., Chen J., Wu S., Zhu J., Zhang D., Gu H., Cui H., Shi S., Xu M., Yao Y., Gong Z., Yang Z., Gu M., Zhou Y., Lianga G. (2018) The spermine synthase OsSPMS1 regulates seed germination, grain size, and yield. *Plant Physiology* 178, 1522–1536.
- Tavernier E., Wendehenne D., Blein J.P., Pugin A. (1995) Involvement of free calcium in action of cryptogein, a proteinaceous elicitor of hypersensitive reaction in tobacco cells. *Plant Physiology* 109, 1025–1031.
- Tavladoraki P., Cona A., Federico R., Tempera G., Viceconte N., Saccoccio S., Battaglia V., Toninello A., Agostinelli E. (2012) Polyamine catabolism: target for antiproliferative therapies in animals and stress tolerance strategies in plants. *Amino Acids* 42, 411–426.
- Thor K., Peiter E. (2014) Cytosolic calcium signals elicited by the pathogen-associated molecular pattern flg22 in stomatal guard cells are of an oscillatory nature. *New Phytologist* 204, 873–881.
- Tiburcio A. F., Altabella T., Bitrián M., Alcázar R. (2014) The roles of polyamines during the lifespan of plants: from development to stress. *Planta* 240, 1–18.
- Tiidema A., Truve E. (2004) Efficient regeneration of fertile barley plants from callus cultures of several Nordic cultivars. *Hereditas* 140, 171–176.
- Tingay S., McElroy D., Kalla R., Fieg S., Wang M., Thornton S., Brettell R. (1997) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated barley transformation. *Plant Journal* 11, 1369–1376.
- Todorova D., Katerova Z., Shopova E., Jodinskiene M., Jurkoniene S., Sergiev I. (2016) Responses of pea plants to heat stress and spermine treatment. *Zemdirbyste Agriculture* 103, 99–106.
- Tracy F.E., Gilliam M., Dodd A.N., Webb A.A.R., Tester M. (2008) NaCl-induced changes in cytosolic free Ca²⁺ in *Arabidopsis thaliana* are heterogeneous and modified by external ionic composition. *Plant Cell Environment* 31, 1063–1073.
- Trejo C.L., Davies W.J., Ruiz P.L. (1993) Sensitivity of stomata to abscisic acid. *Plant Physiology* 102, 497–502.
- Tripathy B.C., Oelmüller R. (2012) Reactive oxygen species generation and signaling in plants. *Plant Signaling and Behavior* 7, 1621–1633.

- Tun N.N., Santa-Catarina C., Begum T., Silveria V., Handro W., Floh E.I.S. (2006) Polyamines induce rapid biosynthesis of nitric oxide (NO) in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant Cell Physiology* 47, 346–354.
- Tuteja N., Mahajan S. (2007) Calcium signaling network in plants. An overview. *Plant Signaling and Behavior* 2, 79-85.
- Urano K., Hobo T., Shinozaki K. (2005) *Arabidopsis* ADC genes involved in polyamine biosynthesis are essential for seed development. *FEBS Letters* 579, 1557–1564.
- USDA Foreign Agricultural Service <https://downloads.usda.library.cornell.edu/usda-esmis/files/5q47rn72z/0g354t050/r494vz32w/production.pdf>
- Verslues P.E., Agarwal M., Katiyar-Agarwal S., Zhu J., Zhu J.-K. (2006) Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. *Plant Journal* 45, 523–539.
- Walters D.R. (2003) Polyamines and plant disease. *Phytochemistry* 64, 97–107.
- Wang W., Vinocur B., Altman A. (2003) Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta* 218, 1–14.
- Wang Y., Ren X., Sun D., Sun G. (2015) Origin of worldwide cultivated barley revealed by NAM-1 gene and grain protein content, *Front Plant Science* 6, 803.
- Wang W., Paschalidis K., Feng J.-C., Song J., Liu J.-H. (2019) Polyamine catabolism in plants: A universal process with diverse functions. *Frontiers in Plant Science* 10, 561.
- Webb A.A.R., McAinsh M.R., Taylor J.E., Hetherington A.M. (1996) Calcium ions as intracellular second messengers in higher plants. *Advances in Botanical Research* 22, 45-96.
- White P.J. (2000) Calcium channels in higher plants. *Biochimica et Biophysica Acta* 1465, 171-189.
- White P.J., Broadley M.R. (2003) Calcium in plants. *Annual Botany (Lond.)* 92, 487–511.
- Williams K. (1997) Interactions of polyamines with ion channels. *Biochemical Journal* 325, 289–297.
- Wu Y., Cosgrove D.J. (2000) Adaptation of roots to low water potentials by changes in cell wall extensibility and cell wall proteins. *Journal of Experimental Botany* 51, 1543-1553.
- Xu W., Cui K., Xu A., Nie L., Huang J., Peng S. (2015) Drought stress condition increases root to shoot ratio via alteration of carbohydrate partitioning and enzymatic activity in rice seedlings. *Acta Physiologiae Plantarum* 37, 9.
- Yamaguchi K., Takahashi Y., Berberich T., Imai A., Miyazaki A., Takahashi T. (2006) The polyamine spermine protects against high salt stress in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters* 580, 6783–6788
- Yamaguchi K., Takahashi Y., Berberich T., Imai A., Takahashi T., Michael A.J., Kusano T. (2007) A protective role for the polyamine spermine against drought stress in *Arabidopsis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 352, 486-490.

Yuan F., Yang H., Xue Y., Kong D., Ye R., Li C., Zhang J., Theprungsirikul L., Shrift T., Krichilsky B., Johnson D.M., Swift G.B., He Y., Siedow J.N., Pei Z.-M. (2014) OSCA1 mediates osmotic-stress-evoked Ca^{2+} increases vital for osmosensing in Arabidopsis. *Nature* 514, 367-371.

Zhang X., Zhang L., Dong F., Gao J., Galbraith D.W., Song C.-P. (2001) Hydrogen peroxide is involved in abscisic acid-induced stomatal closure in *Vicia faba*. *Plant Physiology* 126, 1438–1448.

Zhang Q. (2007) Strategies for developing Green Super Rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 104, 16402–16409.

Zhao F., Song C.-P., He J., Zhu H. (2007) Polyamines improve K^+/Na^+ homeostasis in barley seedlings by regulating root ion channel activities. *Plant Physiology* 145, 1061–1072.

Anhang

Tabelle 2: Verwendete Chemikalien mit Angabe des Herstellers und Katalognummer

Substanz	Formel oder Abkürzung	Firma/Katalog Nr.
3,3 Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid	DAB	Carl Roth CN75.1
2,7-Dichlordihydrofluorescein-diacetat	H ₂ DCFDA	ThermoFisher
2,4-Dichlorphenoxyessigsäure	1-NAA	Sigma-Aldrich (Fluka)
3,6-Dichlor-2-methoxybenzoesäure	Dicamba	Duchefa Biochemie B.V., Harleem, Niederlande
Agar-Agar, Kobe I	(C ₁₂ H ₁₈ O ₉) _n	Sigma-Aldrich 5210.2
Agarose	C ₁₂ H ₁₈ O ₉	Biozym Scientific 840004
Ampicillin Natrium	C ₁₆ H ₁₈ N ₃ O ₄ SNa	Duchefa A0104
Borsäure	BH ₃ O ₃	Sigma-Aldrich 15665
Calciumchloriddihydrat	CaCl ₂ · 2H ₂ O	Sigma-Aldrich 31307
Calciumnitrat	Ca(NO ₃) ₂	Sigma-Aldrich C2786
Coelenterazin	C ₂₆ H ₂₁ N ₃ O ₃	Carl Roth 4094,3
D(+)-Glucose	C ₆ H ₁₂ O ₆	Carl Roth HN06.2
Dimethylsulfoxid	C ₂ H ₆ O ₃	Duchefa D1370
D-Mannitol	C ₆ H ₄ O ₆	Sigma-Aldrich M1902
Diphenyleneiodonium Chlorid	DPI	Sigma-Aldrich D2926
EDTA dinatriumsalzdihydrat	10H ₁₄ N ₂ NaO ₃ · 2H ₂ O	Carl Roth 8043.1
Eisen(III)-chlorid	FeCl ₃	Sigma-Aldrich (Fluka)
Essigsäure	C ₂ H ₄ O ₂	Laborchemie Apolda 579-94-2
Ethanol	C ₂ H ₆ O	Carl Roth K928.4
Ethylenglycol-bis(aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure	EGTA	Sigma-Aldrich (Fluka)
Fleischextrakt		Sigma-Aldrich X975.1
Formaldehyd Lösung	CH ₂ O	Sigma-Aldrich F8775
Guazatine Acetat		Sigma-Aldrich 37915
Isopropanol	C ₃ H ₈ O	Carl Roth T910.1
Kaliumchlorid	KCl	Duchefa PO515
Kaliumdihydrogenphosphat	KH ₂ PO ₄	Fluka 60220

Kaliumhydroxid	KOH	Sigma-Aldrich (Fluka)
Kaliumiodid	KI	AppliChem
L-Arginin	C ₆ H ₁₄ N ₄ O ₂	Carl Roth
L-Glutamin	C ₅ H ₁₀ N ₂ O ₃	Sigma-Aldrich (Fluka)
L-Prolin	C ₅ H ₉ NO ₂	Sigma-Aldrich (Fluka)
Magnesiumchlorid	MgCl ₂	Fluka 63068
Magnesiumsulfat Heptahydrat	MgSO ₄ · 7H ₂ O	Fluka 63140
Mangansulfat Monohydrat	MnSO ₄ x H ₂ O	Merck
Methanol	CH ₃ OH	Merck
MES (2-[N-Morpholino]ethanesulfonicsäure)hydrat	C ₆ H ₁₃ NO ₄ S · xH ₂ O	Sigma-Aldrich M2933
Murashige & Skoog Medium (Basal Salt Mixture) M0221	MS	Duchefa M0221
Murashige & Skoog Medium (ohne NH ₄ NO ₃) M0238	MS-NH ₄ NO ₃	Duchefa M0238
myo-Inositol	C ₆ H ₁₂ O ₆	Sigma-Aldrich (Fluka)
Natriumchlorid	NaCl	Carl Roth 3957.1
Natriumdihydrogenphosphat	NaH ₂ PO ₄	Sigma-Aldrich (Fluka)
Natriumdodecylsulfat	C ₁₂ H ₂₅ NaO ₄ S	Carl Roth 2326.2
Natriumhypochlorit (12%)	NaClO	Carl Roth
Natriummolybdat Dihydrat	Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	Honeywell Riedl-de Haën
Nitroblau Tetrazoliumchlorid	NBT	Carl Roth
Polyethylenglycol	PEG6000	Fluka 95904
Phyto-Agar		Duchefa P1003
Putrescin	C ₄ H ₁₂ N ₂	Sigma P7505
Saccharose	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	Carl Roth 4621.1
Salzsäure	HCl	Merck
Spermin	C ₁₀ H ₂₆ N ₄	Sigma S3256
Spermin-HCl	C ₁₀ H ₂₆ N ₄ · 4HCl	Sigma S1141
Spermidin	C ₇ H ₁₉ N ₃	Sigma S0266
SYBR® Safe - DNA Gel stain		Thermo Fisher Scientific (Invitrogen)
Thiamin-HCl	C ₁₂ H ₁₇ ClN ₄ OS x HCl	Duchefa Biochemie B.V.
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	TRIS	Carl Roth
Triton X-100	C ₁₄ H ₂₂ O(C ₂ H ₄ O) _n	Sigma-Aldrich (Fluka)
Tween 20	C ₅₈ H ₁₁₄ O ₂₆	Carl Roth

Zinksulfat Heptahydrat	ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	Merck
------------------------	--	-------

Tabelle 3: Verwendete Antibiotika mit Angabe der Arbeitskonzentration

Antibiotika	Hersteller	Selektion von	In*	Arbeitskonzentration**
Ampicillin	Duchefa Biochem. B.V.	E. coli	Wasser	100 µg ml ⁻¹
Carbenicillin	Duchefa Biochem. B.V.	A. tumefaciens (AGL-1)	Wasser	25 µg ml ⁻¹
Hygromycin	Carl Roth	H. vulgare A. thaliana		Gerste: 50 µg ml ⁻¹ Arabidopsis: 20 µg ml ⁻¹
Kanamycin	Sigma-Aldrich	E. coli A. tumefaciens		E. coli: 50 µg ml ⁻¹ Agrobakterium: 50 µg ml ⁻¹
Rifampicin	Sigma-Aldrich	A. tumefaciens	DMSO	100 µg ml ⁻¹
Spectinomycin	Duchefa Biochem. B.V.	E. coli A. tumefaciens	Wasser	E. coli: 25 µg ml ⁻¹ Agrobakterium: 25 µg ml ⁻¹
Streptomycin	Sigma-Aldrich	E. coli (TOP10)	Wasser	10-50 µg ml ⁻¹
Tetracycline	Sigma-Aldrich	E. coli (XL1-Blue)	50% Ethanol	10 µg ml ⁻¹
Ticarcillin	Duchefa Biochem. B.V.	A. tumefaciens	Wasser	150 µg ml ⁻¹

* Antibiotika welche in Wasser oder 50 % Ethanol gelöst werden, sind vorher steril filtriert

**Typische Arbeitskonzentration können variieren für die verschiedenen Organismen und Plasmide

Tabelle 4: Verwendete Enzyme mit Herstellerangabe und Katalognummer

Enzyme	Firma/Katalog Nr.	verwendet für
<i>AscI</i>	New England Biolabs (NEB) R0558S	spezifische Hydrolyse von DNA Fragmenten
<i>BamHI</i> -HF	New England Biolabs (NEB) R3136S	spezifische Hydrolyse von DNA Fragmenten
DNase I (RNase-frei)	Omega Bio-tek Inc, Norcross, USA	Hydrolyse von DNA bei der Isolation von RNA
<i>Go Taq</i> DNA polymerase	Promega M3175	Screening PCR
<i>HINDIII</i>	New England Biolabs (NEB) R0104S	spezifische Hydrolyse von DNA Fragmenten
<i>KpnI</i>	New England Biolabs (NEB) R3142S	spezifische Hydrolyse von DNA Fragmenten
<i>M-MuLV</i> Reverse Transcriptase RNase H ⁻	New England Biolabs (NEB) M0253S	cDNA Synthese
<i>Phusion</i> [®] High-Fidelity DNA-Polymerase	Finnzymes F-540S	PCR-Amplifikation
RNase A MBI	Fermentas EN0531	RNA-Hydrolyse nach cDNA-Synthese
<i>SfiI</i>	New England Biolabs (NEB) R0123S	spezifische Hydrolyse von DNA Fragmenten
<i>SpeI</i>	New England Biolabs (NEB) R0133S	spezifische Hydrolyse von DNA Fragmenten
SuperScript II Reverse Transcriptase	Invitrogen 108064-022	cDNA-Synthese
T4 DNA Ligase	New England Biolabs (NEB) M0202S	Ligation von DNA Fragmenten
TSAP (Thermosensitive alkaline phosphatase)	Promega M9910	Dephosphorylation von DNA
<i>XmaI</i>	New England Biolabs (NEB) R0180S	spezifische Hydrolyse von DNA Fragmenten

Tabelle 5: Verwendete Kits mit Herstellerangabe und Katalognummer

Kit	Firma/Katalog Nr.
DNeasy Plant Mini kit	Qiagen 69104
NucleoBond Xtra Midi Plasmid DNA Purification kit	Macherey-Nagel 740410.10
Spectrum™ Plant Total RNA kit	Sigma-Aldrich STRN50
Wizard Gel Clean-Up and Purification System	Promega A9282
Wizard Plus SV Miniprep DNA Purification kit	Promega A1460

Tabelle 6: Verwendete Bakterienstämme und deren Selektion

Stamm	Spezies	Firma	Selektion, Konzentration
Top10	<i>E. coli</i>	Invitrogen Darmstadt No.C4040	Streptomycin 50 µg ml ⁻¹
XL1-Blue	<i>E. coli</i>	Stratagene, San Diego, USA	Tetracyclin 10 µg ml ⁻¹
GV3101	<i>A. tumefaciens</i>	laborinterner Stock	Rifampicin, Carbenicillin 25 µg ml ⁻¹ Streptomycin, Streptomycin 50 µg ml ⁻¹
AGL-1	<i>A. tumefaciens</i>	Dr. Imani, Universität Gießen	Rifampicin, Carbenicillin 25 µg ml ⁻¹

Tabelle 7: Verwendete Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz von 5' nach 3'
Amplifizierung der Gesamtsequenz	
SPMS1 _F	AAAAAAGGATCCATGGAGGGTGGAGGCGCAAG
SPMS1 _R	AAAAAAGGATCCCTAGGAAGCGGTGATAGCGCTGTC
Amplifizierung der Gesamtsequenz	
SPMS2 _F	AAAAAAGGATCCATGGAGGGTGGAGACGTAAGAA
SPMS2 _R	AAAAAAGGATCCCTAAGCGGTAAGAATTTCACTGTG
Amplifizierung der Gesamtsequenz	
SPDS _F	GAGATGATTACCCACCTTCC
SPDS _R	CTTCCCTCTGTCTACGCTA
RNAi-Konstrukt 1	
SPMS1/2_1_F	AAAAAACTAGTGGCGCGCCGAAATGTTTCTGCAGCG- GCAGT
SPMS1/2_1_R	AAGGTACCGGATCCAAGCTTGATTGTTGAAGTACTGC- GCTTTGC
RNAi-Konstrukt 2	
SPMS1/2_2_F	AAAAAACTAGTGGCGCGCCTCAGATCCAATTGGGCC- AGCC
SPMS1/2_2_R	AAGGTACCGGATCCAAGCTTAGATGTGTGTGCAGCCA CATACTTT
Überexpression-Konstrukt 1	
pLH7000_F	TCATGTGTTGAGCATATAAGAAACC
SPMS1_oe_F	ATGGAGGGTGGAGGCGCAAG
pUBI-AB_F	TTGATCTTGATATACTTGGATGATGG
pUBI-AB_R	CCCATCTCATAAATAACGTCATGC
pLH6000_F	TCATGTGTTGAGCATATAAGAAACC
pLH6000_R	TTTCACGCCCTTTTAAATATCC
Überexpression-Konstrukt 2	
pLH7000_F	TCATGTGTTGAGCATATAAGAAACC
SPMS2_oe_F	GTCCTTGTGCTTGATGGTATTGT
pUBI-AB_F	TTGATCTTGATATACTTGGATGATGG
pUBI-AB_R	CCCATCTCATAAATAACGTCATGC
pLH6000_F	TCATGTGTTGAGCATATAAGAAACC
pLH6000_R	TTTCACGCCCTTTTAAATATCC

qRT-PCR

SPMS1_rt_F	GCTACTAAAGATGGACGAGAGATGAG
SPMS1_rt_R	CTTCACTGGTTTCGCCGTTG

qRT-PCR

SPMS2_rt_F	CAACTTCCTGGCACCATAAA
SPMS2_rt_R	CTGGTTCTGCTGATGTTTCCTCT

qRT-PCR

SPDS_rt_F	CGCCTACCAGGAGATGATTACC
SPDS_rt_R	AGGGAAGAAGCTGCTTGGACACA

Alle verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland) hergestellt.

Tabelle 8: Zusammensetzung der Gerstennährlösung (vollkonzentriert)

Makronährstoffe:	2,5 mM Ca	CaCl ₂ x 2 H ₂ O
	0,25 mM N	NH ₄ NO ₃
	0,5 mM K	K ₂ SO ₄
	0,6 mM Mg	MgCl ₂ x 6 H ₂ O
	0,1 mM P	KH ₂ PO ₄
	2,0 mM Si	Silizium (Na ₂ SiO ₃)
Mikronährstoffe:	0,5 µM Mn	MnSO ₄ x H ₂ O
	1,0 µM B	H ₃ BO ₃
	0,5 µM Zn	ZnSO ₄ x 7 H ₂ O
	0,2 µM Cu	CuSO ₄ x 5 H ₂ O
	0,3 mM Fe	Fe(III)-EDTA (C ₁₀ H ₁₂ FeNaO ₈)
	0,01µM Mo	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄

Die pH-Wert Einstellung erfolgte mittels NaOH auf 5,8.

Tabelle 9: Zusammensetzung des LB-Mediums

<u>Substanz</u>	<u>Konzentration</u>
Trypton	1%
Hefeextrakt	0,5%
NaCl	10 mM
Agar	2%

Das LB-Medium wurde 20 min bei 121°C autoklaviert. Nach dem Abkühlen auf 60°C wurden 50 µg ml⁻¹ Ampicillin (aus 50 mg ml⁻¹ Stock) hinzupipettiert und danach je 25 ml des LB-Mediums in Petrischalen gefüllt. Die Platten wurden 30 min unter einer Sterilbank getrocknet und anschließend bei 4°C aufbewahrt.

Tabelle 10: Zusammensetzung des SOC Mediums

<u>Substanz</u>	<u>Konzentration</u>
Trypton	2%
Hefeextrakt	0.5%
NaCl	10 mM
KCl	2.5 mM
MgSO ₄	10 mM
Glucose	10 mM

Das SOC Medium wurde 20 min bei 121°C autoklaviert, und nach einer Abkühlzeit wurde eine sterile Lösung bestehend aus 20 mM MgSO₄ und 20 mM Glucose hinzugefügt. Das Medium wurde in Aliquots bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

Tabelle 11: Zusammensetzung der Kulturmedien zur Anzucht transgener Kalli

Substanz	Kallus	Kallus	Spross	Wurzel
	Induktions- medium (C-)	Induktions- medium (C+)	Induktions- medium (T)	Induktions- medium (R)
	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹
MS Salze (Duchefa M0221)	4300	4300	2700 (NH ₄ NO ₃ -frei)	2700 (NH ₄ NO ₃ -frei)
CuSO ₄ x 5H ₂ O	1,2 (5 µM)	1,2 (5 µM)	1,2 (5 µM)	0,6 (2,5 µM)
Maltose	30000	30000	20000	20000
Thiamine-HCl	1	1	0,4	0,4
Myo-Inositol	250	250	100	125
Caseinhydrolysat	1000	1000		500
L-Prolin	690	690		345
Dicamba (3,6-Dichlor-2- methoxybenzoesäure)	2,5	2,5		
NH ₄ NO ₃			165	165
Glutamin			750	750
2,4-D (2,4-Dichlorphenoxy- essigsäure)			2,5	
Ticarcillin + Clavulansäure		150	150	150
Hygromycin B bei binärem Vektor <i>pLH6000</i>		0,05	0,05	0,05
Bialaphos bei binärem Vektor <i>pLH7000</i>		5	2,5	2,5

(Harwood et al. 2009)

Alle Medien wurden mit 6 g L⁻¹ Agar versehen, und der pH-Wert der einzelnen Lösungen wurde vor dem Autoklavieren (21 min bei 121°C) auf 5,9 eingestellt. Das Sprossinduktionsmedium wurde auf einen pH-Wert von 5,6 eingestellt. Nach dem

Abkühlen wurden den Medien unter sterilen Bedingungen die benötigten Antibiotika zugegeben.

Tabelle 12: Zusammensetzung des YEB-Mediums zur Kultivierung der Agrobakterien

<u>Substanz</u>	<u>Konzentration</u>
Fleischextrakt	5 g L ⁻¹
Hefeextrakt	1 g L ⁻¹
Caseinhydrolysat	5 g L ⁻¹
Saccharose (D+)	5 g L ⁻¹
MgSO ₄ x 7H ₂ O	0,49 g L ⁻¹
Agar	20 g L ⁻¹

Das Medium wurde autoklaviert (121°C, 21 min), und nach erfolgtem Abkühlen wurden die Antibiotika zugefügt (Rifampicin (Rf25) und Carbenicillin (Cb25) (Stock 25 mg L⁻¹) sowie Streptomycin (Sp50) und Streptomycin (Sm50) (Stock 50 µg ml⁻¹) mit jeweils 500µl).

Tabelle 13: Zusammensetzung des LB-Mediums zur Kultivierung der Agrobakterien

<u>Substanz</u>	<u>Konzentration</u>
NaCl	10 g L ⁻¹
Hefeextrakt	5 g L ⁻¹
BactoTryphan	20 g L ⁻¹

Auch hier wurde das Medium autoklaviert (121°C, 21 min) und mit Antibiotika versetzt. Die benötigten Antibiotika waren in diesen Fall: Rifampicin (Rf25) und Carbenicillin (Cb25) mit jeweils 250µl (Stock 25 µg ml⁻¹).

Tabelle 14: Zusammensetzung des SOC Mediums für elektrokompetente Agrobakterien

<u>Substanz</u>	<u>Konzentration</u>
Trypton	20 g L ⁻¹
Hefeextrakt	5 g L ⁻¹
NaCl	0,58 g L ⁻¹
KCl	0,18 g L ⁻¹

Nach dem Autoklavieren (121 °C, 21 min) wurde 10 ml 2M MgSO₄ und 20 ml 1M Glucose hinzugefügt.

Tabelle 15: Zusammensetzung des Flüssigmediums zur Anzucht von Arabidopsispflanzen

<u>Substanz</u>	<u>Konzentration</u>
MS + Vitamine	2,2 g L ⁻¹
Saccharose	10 g L ⁻¹

Publikationen, Poster und Vorträge

Poster:

DGP Tagung, Kiel, 2011: (How) do polyamines mediate stress tolerance in barley?

DGP Tagung, Bonn, 2012: Spermine-modulator of barley drought stress tolerance via stomatal closure?

IZN-Evaluation Meeting, Halle (Saale), 2012: Cross-talk of polyamines and calcium signalling in stress tolerance of barley (*Hordeum vulgare*)

DGP Tagung, Halle (Saale), 2014: (How) do polyamines mediate stress tolerance in barley?

DGP Tagung, Göttingen, 2015: Spermine - a universal player in the response of plants to drought stress?

Vorträge:

IZN-Annual Progress Meeting, Halle (Saale), 2010, 2011, 2013: Cross-talk of polyamines and calcium signalling in stress tolerance of barley (*Hordeum vulgare*)

Eidesstattliche Versicherung

Hiermit erkläre ich, dass ich mich mit der vorliegenden Dissertationsschrift erstmals um die Erlangung eines Doktorgrades bewerbe. Ich versichere an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe angefertigt, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt, und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Halle/Saale, den 30.10.2019

Ort, Datum

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Günther', written in a cursive style.

Unterschrift

Danksagung

Ich möchte mich in an dieser Stelle herzlich bei allen bedanken, die mich bei der Anfertigung dieser Dissertation unterstützt haben. Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Edgar Peiter für die Betreuung und Bereitstellung des Projektes, die uneingeschränkte Unterstützung mit vielen wertvollen Hinweisen und die stete Diskussionsbereitschaft.

Frau Prof. Dr. Birgit Dräger möchte ich danken, welche zusammen mit Prof. Dr. Edgar Peiter im Rahmen des Interdisziplinären Zentrums für Nutzpflanzenforschung (IZN) dieses Projekt betreute und mich ermutigte dieses spannende Thema zu bearbeiten.

Der gesamten Arbeitsgruppe Pflanzenernährung möchte ich danken für die gemeinsame Zeit welche geprägt war von gegenseitiger Unterstützung im Labor und Gewächshaus und gemeinsamen Diskussionen auch über das Wissenschaftliche hinaus.

Vielen Dank an die Doktoranden Bastian, Dagmar, Jan, Julia, Mario, Nufaid, Ricardo, Vicky und Xuefeng, es war eine wunderbare Zeit.

Für die exzellente technische Unterstützung und Hilfe in allen Belangen bedanke ich mich bei Anja Janssen, Elvira Leibrich, Kristin Peter, Liane Freitag, und Tina Peiter-Volk.

Für all die organisatorische Unterstützung über den Laboralltag hinaus, bedanke ich mich bei Marion Müller.

Den wissenschaftlichen Mitarbeitern Dr. Heidrun Beschow, Dr. Wolfgang Gans danke ich für die wissenschaftlichen Fragen und Denkanstöße während der Labmeetings. Dr. Kathrin Thor möchte ich für die Betreuung bei der Mikroskopie bedanken. Sie hat mir, nicht nur einmal, entscheidende Hilfe sowohl theoretisch als auch praktisch geben können wenn mal wieder alles „dunkel“ blieb.

Alle Studenten welche ich während meiner Promotionszeit betreute gilt mein Dank für die Unterstützung durch ihre Hilfe im Labor und wertvollen Ergebnisse.

Ein besonders großer Dank gilt Dr. Albrecht Serfling für das Korrekturlesen und die intensive Auseinandersetzung mit meiner Arbeit.

Speziell und von ganzem Herzen danke ich meinen Freunden Netti, Tina, Serfling`s, Klugmann`s, Otschik`s und meiner gesamten Familie für die unermüdliche Motivierung, Stärkung und gemeinsame Zeit.

Curriculum Vitae

Persönliche Daten

Name: Zimmermann geb. Nowak
Vorname: Nancy
Geburtsdatum: 28.12.1979
Geburtsort: Halle/Saale
Wohnsitz: Eigene Scholle 55, 06120 Halle/Saale
Familienstand: Verheiratet, 2 Kinder
Staatsangehörigkeit: Deutsch

Ausbildung & Beruflicher Werdegang

1986-1989 Grundschule
1989-1992 Sekundarschule G.E. Lessing
1992-1998 Mathematisch-naturwissenschaftliches Gymnasium Georg-Cantor
Halle
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife
1998-2001 Ausbildung zur Steuerfachangestellten
2001-2008 Biologiestudium an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Diplomarbeit an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg /
Institut für Geobotanik und Botanischer Garten und Institut für
Pharmazeutische Biologie und Pharmakologie
„Untersuchungen zum Calystegin- und Polyamingehalt in
verschiedenen Cochlearia Arten“
Abschluss: Diplom
2008 wissenschaftliche Mitarbeiterin
im Projekt „Process Analytical Technology (PAT) und Ceramide aus
Pflanzen“ – ForMaT Phase I and der Martin-Luther-Universität Halle-
Wittenberg / Institut für Pharmazie
Prof. Neubert / Dr. Volk

- 2010-2013 wissenschaftliche Mitarbeiterin
im IZN Projekt "Polyamines and drought tolerance: Crosstalk of polyamine and calcium signalling in stress tolerance of barley" an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg / IAEW Pflanzenernährung
Prof. Peiter
- 2013-2014 Elternzeit
- 2014-2015 wissenschaftliche Mitarbeiterin
im IZN Projekt "Polyamines and drought tolerance: Crosstalk of polyamine and calcium signalling in stress tolerance of barley" an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg / IAEW Pflanzenernährung
Prof. Peiter
- seit 2016 Koordinatorin des GRK 2155 ProMoAge "Protein Modification a Key Mechanism for Ageing" an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg / Klinik für Herzchirurgie
Prof. Simm
- seit 2018 technische Mitarbeiterin an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg / Institut für Biologie
Prof. Humbeck