

Molekularbiologische Untersuchung
auf erhöhte Salz- und Trockenstresstoleranz durch
Überexpression des GRAS-Transkriptionsfaktors
SLC7 in *Populus × canescens*

von

Jakob Fromme

geboren am

05. Februar 1985

Bachelorarbeit

im Studiengang Biotechnologie

der Hochschule für angewandte Wissenschaften Hamburg

Hamburg, Mai 2017

- | | |
|--------------|---|
| 1. Gutachter | Prof. Dr. Oliver Ullrich
- HAW Hamburg |
| 2. Gutachter | Dr. Tobias Brüggemann
- Thünen-Institut für Forstgenetik, Großhansdorf |

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	4
Zusammenfassung	5
1. Einleitung.....	6
1.1 Gattung Populus.....	6
1.2 Entstehung von pflanzlichem Stress	8
1.2.1 Auswirkungen von Salzstress	8
1.2.2 Auswirkungen von Trockenstress	9
1.3 Kompensationsmechanismen.....	9
1.3.1 Salzstress.....	10
1.3.2 Trockenstress.....	10
1.4 Hormonelle Regulation.....	10
1.5 GRAS-Protein <i>SCL7</i>	11
1.6 Ausgewählte Gene.....	11
1.6.1 α -Amylase.....	12
1.6.2 Na ⁺ /H ⁺ -Antiporter	12
1.6.3 Transkriptionsfaktor <i>SCL4</i>	13
1.6.4 Cellulose-Synthasen	13
1.7 Callose-Synthase	14
1.8 Zielsetzung	14
2. Material und Methoden.....	14
2.1 Datenbanken	14
2.2 Material	14
2.2.1 Chemikalien	14
2.2.2 Kits.....	15
2.2.3 Geräte	15
2.2.4 Pflanzenmaterial	15
2.2.5 Primer	16
2.2.6 Expression der ausgewählten Gene	17
2.3 Methoden	19
2.3.1 Gewebekultur	19
2.3.2 Test auf Trockenstress	20
2.3.3 Bestimmung der Wurzel-Biomasse	20
2.3.4 RNA.....	20
2.3.5 qRT-PCR	23

Inhaltsverzeichnis

2.3.6	Fehlerrechnung	24
2.3.7	NanoDrop	25
3.	Ergebnisse	25
3.1	Phänotypisierung.....	26
3.1.1	Einfluss von Licht.....	28
3.1.2	Wurzelmasse.....	32
3.1.3	Höhenwachstum unter Trockenstress	33
3.2	Molekularbiologische Untersuchungen	34
3.2.1	Transkriptionsfaktor <i>SCL7</i>	34
3.2.2	Transkriptionsfaktor <i>SCL4</i>	38
3.2.3	α -Amylase <i>AMY1</i>	39
3.2.4	Cellulosesynthase <i>CesA7</i>	41
3.2.5	Callosesynthase <i>CaIS1</i> und Na^+/H^+ -Antiporter <i>SOS1</i>	42
4.	Diskussion.....	44
4.1	Phänotypische Untersuchungen	44
4.1.1	Gesteigerte Produktion von Wurzelmasse unter Salzstress.....	44
4.1.2	Höhenwachstum unter Salz- und Trockenstress.....	44
4.1.3	Längere Wurzeln unter Trockenstress.....	45
4.1.4	Beleuchtungsstärke als wichtiger Faktor bei Salz- und Trockenstress.....	45
4.2	Expressionsanalysen.....	46
4.2.1	<i>SCL7</i> -Expression in Pflanzen aus in vitro-Kultur und Gewächshaus	46
4.2.2	Gegensätzliche Expression von <i>SCL7</i> und <i>SCL4</i>	47
4.2.3	Erhöhte Expression der α -Amylase <i>AMY1</i>	47
4.2.4	Cellulosesynthase <i>CesA7</i>	48
4.2.5	Callosesynthase <i>CaIS1</i> und Na^+/H^+ -Antiporter <i>SOS1</i>	48
5.	Ausblick	49
6.	Literatur.....	50
7.	Anhang.....	53
8.	Eidesstattliche Erklärung.....	57

Abkürzungsverzeichnis

ABA	Abscisinsäure	mol	Stoffmenge
Abb.	Abbildung	NADP ⁺	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
ADP	Adenosindiphosphat	NaOH	Natriumhydroxid
Ca	Calcium	ng	Nanogramm
cDNA	komplementäre DNA	nm	Nanometer
cm	Zentimeter	PCR	Polymerase Chain Reaction
CP	Crossing-Point	pH	Negativ dekadischer Logarithmus der H ⁺ -Ionen
CO ₂	Kohlenstoffdioxid	PEG	Polyethylenglycol
Diagr.	Diagramm	PFD	Photonen-Flussdichte
DNA	Desoxyribonukleinsäure	qRT-PCR	quantitative Real-Time-PCR
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat	RNA	Ribonucleinsäure
DTT	Dithiothreitol	ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	rpm	Umdrehungen pro Minute
<i>g</i>	Fallbeschleunigung	s	Sekunde
g	Gramm	SCL	Scarecrow-Like
GA	Gibberellinsäure	SDS	Natriumdodecylsulfat
HCl	Chlorwasserstoff (Salzsäure)	ssDNA	Einzelsträngige DNA
HPLC	Hochdruckflüssig- chromatographie	Tab	Tabelle
Hz	Hertz [1/s]	TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
K	Kalium	µg	Mikrogramm
L	Liter	µL	Mikroliter
m	Meter	µm	Mikrometer
M	Mol	% (v/v)	Volumenprozent
Mbp	Megabasenpaare	% (w/v)	Massenprozent
min	Minute	°C	Grad Celsius
mL	Milliliter		
mM	Millimol		

Zusammenfassung

In einer Studie von Ma *et al.* (2010) wurde der GRAS-Transkriptionsfaktor *SCL7* aus *P. euphratica* in *A. thaliana* überexprimiert. In der Folge wurde eine gesteigerte Salz- und Trockenstresstoleranz festgestellt. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Frage, ob eine Überexpression von *SCL7* in *P. × canescens* ebenfalls zu einer erhöhten Toleranz gegenüber Salz- und Trockenstress führt.

Dafür wurden entsprechend transformierte Pflanzen gezielt diesen Stressfaktoren ausgesetzt. Der Einfluss der genetischen Veränderung wurde makroskopisch durch Phänotypisierung und auf molekularer Ebene durch Expressionsanalysen zuvor festgelegter Gene untersucht.

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass das Wachstum der transgenen Pflanzen unter Salzstress weniger beeinträchtigt wurde. Zudem wurde bei ihnen eine verstärkte Zunahme an Wurzelmasse unter Salz- und Trockenstress festgestellt. Zu erhöhten Expressionen kam es bei den Genen der α -Amylase *AMY1* und des Transkriptionsfaktors *SCL4*.

Diese Arbeit zeigt, dass eine Überexpression von *SCL7* in *P. × canescens* zu einer Steigerung der Salz- und Trockenstresstoleranz führte.

1. Einleitung

Mit einer wachsenden Erdbevölkerung steigt auch der Bedarf an landwirtschaftlich nutzbaren Flächen zur Nahrungsmittelproduktion. Hinzu kommt ein stetig wachsender Bedarf an Flächen zum Anbau von erneuerbaren Energieträgern. Letzterer wird durch die von der Bundesregierung beschlossene Energiewende noch weiter verstärkt. Eine zukünftige Konkurrenz dieser Bedürfnisse kann durch die Erschließung von Flächen vermieden werden, die aus Mangel an Nährstoffen oder zu hohen Salzgehalten für die Nahrungsmittelproduktion nicht in Frage kommen.

Diese Arbeit untersucht die Möglichkeit einer Pappelart durch genetische Veränderungen eine erhöhte Toleranz gegenüber widrigen Umweltbedingungen zu verleihen. Derart optimiert könnte sie als regenerativer Energie- und Biopolymerproduzent auf Grenzertragsstandorten eingesetzt werden.

Im Vorfeld dieser Arbeit wurde der GRAS-Transkriptionsfaktor *SCL7* in *Populus × canescens* überexprimiert (Brügmann, 2017). Eine Studie von Ma *et al.* (2010) hat gezeigt, dass die heterologe Überexpression dieses Gens in *Arabidopsis thaliana* zu einer erhöhten Toleranz gegenüber Salz- und Trockenstress führt. Hier soll geprüft werden, ob sich diese Eigenschaft auch auf die Pappel übertragen lässt.

1.1 Gattung *Populus*

Pappeln sind überwiegend in den gemäßigten Klimazonen der nördlichen Hemisphäre beheimatet. Sie zählen zu der Familie der *Salicaceae*, den Weidengewächsen. Angaben über die Anzahl bekannter Arten variieren sehr stark. Eckenwalder (1996) definiert 29 Arten, die wiederum in sechs Sektionen aufgeteilt werden (Tabelle 1). Die Arten einer Sektion vereinen morphologische und reproduktive Merkmale. So hybridisieren jeweils die Arten einer Sektion miteinander, wobei die Gattungen *Tacamahaca* und *Aigeiros* wechselseitig hybridisieren.

In Deutschland sind Schwarzpappeln (*P. nigra*), Silberpappeln (*P. alba*) und Zitterpappeln (*P. tremula*) heimisch. Hinzu kommt die Graupappel (*P. × canescens*), ein natürlicher Hybrid aus Silber- und Zitterpappel (Aas, 2006).

Einleitung

Tabelle 1: **Die sechs Sektionen der Gattung Populus, aufgeteilt nach Klimazonen.**

Der Name Populus steht dabei sowohl für die Art als auch für eine Sektion. Unterstrichene Arten kommen in unterschiedlichen Klimazonen vor. Einteilung nach Eckenwalder (1996).

	<i>Abaso</i>	<i>Turanga</i>	<i>Leucoides</i>	<i>Aigeiros</i>	<i>Tacamahaca</i>	<i>Populus</i>
West-Eurasien + Nord-Afrika	-	<u><i>P. euphratica</i></u>	-	<u><i>P. nigra</i></u>	<u><i>P. laurifolia</i></u>	<i>P. alba</i> <u><i>P. tremula</i></u>
Ost-Eurasien	-	<u><i>P. euphratica</i></u> <i>P. pruinosa</i>	<i>P. glauca</i> <i>P. lasiocarpa</i>	<u><i>P. nigra</i></u>	<i>P. ciliata</i> <u><i>P. laurifolia</i></u> <i>P. simonii</i> <i>P. suaveolens</i> <i>P. szechuanica</i> <i>P. yunnanensis</i>	<i>P. adenopoda</i> <i>P. alba</i> <i>P. gamblei</i> <i>P. sieboldii</i> <u><i>P. tremula</i></u>
Ost-Afrika	-	<i>P. ilicifolia</i>	-	-	-	-
Nord-Amerika	<i>P. mexicana</i>	-	<i>P. heterophylla</i>	<i>P. deltoides</i> <i>P. fremontii</i>	<i>P. angustifolia</i> <i>P. balsamifera</i> <i>P. trichocarpa</i>	<i>P. grandidentata</i> <i>P. guzmanantlensis</i> <i>P. monticola</i> <i>P. simaroa</i> <i>P. tremuloides</i>

Die Ansprüche an den Wachstumsstandort variiert je nach Pappelart. *P. nigra* wächst auf Böden mit guter Durchwurzelbarkeit und einer hohen Nährstoff- und Wasserversorgung, *P. alba* und *P. tremula* auch an mäßig nassen bis trockenen Standorten mit schweren Lehmböden. Letztere eignen sich dadurch u.a. als Pioniergehölze zur Wiederaufforstung von durch Waldbrände oder Bergbau entstandenen Brachflächen. Bis auf *P. lasiocarpa* sind alle Arten der Gattung *Populus* zweihäusig, d.h. es kann zwischen weiblichen und männlichen Pflanzen unterschieden werden. Die Vermehrung erfolgt sexuell über Bestäubung oder vegetativ über Stamm- und Astteile, Stockausschläge und nach oben austreibende Wurzelschösslinge (Bielefeldt *et al.*, 2008).

Das schnell wachsende Gehölz erreicht Höhen von 30-45 Metern. Durch einen geraden Wuchs und einen ausgeprägten Hauptstamm spielen Pappeln eine wichtige Rolle als Holzlieferant. Die wirtschaftliche Nutzung erfolgt meist durch eine Kultivierung in Kurzumtriebplantagen. Auf diesen wird das Holz nach Wachstumsperioden von wenigen Jahren abgeholzt. Aus den im Boden verbliebenen Wurzeln bilden sich neue Triebe. Die auf Kurzumtriebplantagen gewonnene Biomasse wird neben der Produktion von Holzwerkstoffen meist als Festbrennstoff zur Energiegewinnung genutzt (Wühlisch, 2016).

Für die Forstgenetik ist die Pappel eine wichtige Modellpflanze. Sie zeichnet sich durch schnelles Wachstum, einfache vegetative Vermehrung und anspruchslose Kultivierungsbedingungen, besonders unter *in vitro*-Bedingungen, aus. Auch steht ein etabliertes, auf *Agrobacterium tumefaciens* basierendes, Verfahren für genetische Veränderungen zur Verfügung (Kempken und Kempken, 2012).

Das Genom eines weiblichen Individuums von *P. trichocarpa* wurde 2006, als das erste eines Baumes, vollständig sequenziert. Der diploide ($2n = 38$) Satz an Chromosomen codiert mit 485 Mbp mehr als 45000 Proteine (Tuskan *et al.*, 2006).

1.2 Entstehung von pflanzlichem Stress

Durch die lebenslange Bindung an einen Standort sind Pflanzen in der Lage sich an Veränderungen ihrer Umgebungsbedingungen anzupassen. Stress setzt ein, wenn diese die Möglichkeiten zur Anpassung überschreiten. Dazu reicht bei biotischen Stressoren (tierische Schädlinge, Pilze, Bakteriosen, Viren) allein deren Anwesenheit aus. Bei abiotischen Faktoren (Strahlung, Temperatur, anorganische Salze, Wasser) ist sowohl ein Überangebot als auch ein Mangel stressauslösend. Das jeweilige Optimum ist für jede Art ein anderes. Auch gibt es große Unterschiede, ab welchem Grad der Abweichung Mechanismen der Anpassung versagen und Stress empfunden wird.

1.2.1 Auswirkungen von Salzstress

Eine Versalzung von Böden entsteht durch die Anreicherung von löslichen Salzen wie Natriumchlorid oder Magnesiumsulfat. Besonders in Ländern mit einem trockenen Klima stellt sie für die Landwirtschaft ein zunehmend ökologisches und wirtschaftliches Problem dar. Hohe Salzkonzentrationen können dazu führen, dass die bewirtschafteten Flächen weniger Erträge abwerfen oder nur noch eingeschränkt nutzbar sind. Natürliche Salzquellen sind Überflutungen mit Meerwasser, NaCl-haltige Aerosole in Küstennähe oder die Verwitterung von Gesteinen. Zu den anthropogenen Quellen zählt der Einsatz von Düngemitteln, welche zu einem Großteil aus Salzen bestehen. Auch intensive Bewässerungen mit salzhaltigem Wasser führt zu einer Anreicherung im Boden. Gerade in trockenen Gegenden und einem unzureichenden Drainagesystem verdunstet ein Großteil des Wassers und lässt die enthaltenen Salze zurück (Qadir *et al.*, 2014).

Salzstress greift tief in physiologische und biochemische Prozesse von Pflanzen ein. Mit zunehmender Konzentration wird Wasser von Salzen stark im Boden gebunden und steht der Pflanze nicht mehr zur Verfügung. Im Zytoplasma führt ein Überschuss an Na^+ und Cl^- zu einem Ungleichgewicht der gelösten Ionen. Besonders negativ wirkt sich das Verhältnis von K^+ und Ca^{2+} zu Na^+ auf die Funktion von Plasmamembran und Enzymaktivität aus (Frias *et al.*, 1996). Salzkonzentrationen von mehr als 0,4 M NaCl inhibieren die meisten Enzyme durch Störung der elektrostatischen Wechselwirkungen und hydrophoben Effekte. In niedrigeren Konzentrationen könnten negativ geladene Cl^- -Ionen die Bindung an RNA und anionische Metaboliten behindern, während Na^+ -Ionen eine erhöhte Anwesenheit von positiven Ladungsträgern wie Kalium oder Magnesium vortäuschen könnten

(Serrano *et al.*, 1999). Derart gestresst sind die Pflanzenzellen in ihrer Fähigkeit zu Wachstum, Differenzierung und Morphogenese beeinträchtigt (Munns, 2002).

1.2.2 Auswirkungen von Trockenstress

Die Verfügbarkeit von Wasser ist für Pflanzen essentiell. Ähnlich wie durch Salzstress entsteht auch bei Trockenheit hyperosmotischer Stress. Je nach Stärke und Dauer können ein verlangsamtes Wachstum, reduzierte bis fehlende Fruchtbildung und der Tod der Pflanze die Folge sein. Wasserverluste führen zu einer Verschiebung der Ionengleichgewichte, was sich negativ auf die Enzymaktivitäten auswirken kann. Auch die Reduktion des Zellurgors kann eine Folge sein. Dieser ist wesentlich an der Zellstreckung beteiligt, einem wichtigen Prozess des pflanzlichen Wachstums. Bei ausreichender Wasserversorgung ist der Zellurgor hoch. Die Streckung der Zelle beginnt mit einem Absinken des apoplastischen pH-Wertes. Dieser bewirkt eine Weitung der Zellwand und so einem Abfall des Zellurgors. Es kommt zu einer Streckung der Zelle durch Angleichen des Zellurgors an das physiologische, hohe Niveau (Laskowska-Kosegarten, 2001).

Trockenstress beeinflusst auch die Photosynthese, deren Edukte größtenteils aus Wassermolekülen bestehen. Aber auch die Versorgung mit Kohlendioxid kann betroffen sein. Denn sowohl Salz- als auch Trockenstress führen zu einer vermehrten Synthese des Phytohormons Abscisinsäure (Zhu, 2002). Durch dieses werden u.a. die Spaltöffnungen an den Blattunterseiten geschlossen, um weitere Wasserverluste durch Verdunstung zu minimieren. Diese Öffnungen dienen aber auch dem Gasaustausch von Kohlendioxid und Sauerstoff zwischen der Atmosphäre und dem Thylakoid im Inneren der Chloroplasten (Laskowska-Kosegarten, 2001).

1.3 Kompensationsmechanismen

Entsprechend ihrem bevorzugtem Habitat verfügen Pflanzen über unterschiedlich stark ausgeprägte Mechanismen zur Anpassung und Kompensation von wechselnden Umweltbedingungen. In Bezug auf ihre Toleranz gegenüber Salzstress können Pflanzen in Halophyten und Glykophyten unterteilt werden. Während Halophyten noch bei Konzentrationen von 0,5 M NaCl ihre Fähigkeit zu Wachstum und Fortpflanzung beibehalten, weisen Glykophyten bereits bei 25 mM NaCl erste Wachstumsstörungen auf (Munns, 2002). Halophyten sind durch ihre Salztoleranz meist auch toleranter gegenüber Trockenstress.

1.3.1 Salzstress

Schutz vor den toxischen Einflüssen hoher Ionenkonzentrationen kann eine Verstärkung der äußeren Zellwand und damit einer Absenkung ihrer Permeabilität durch vermehrte Cellulosesynthese bewirken (Endler *et al.*, 2015). Auch kann die Ausbreitung eingedrungener Salze in benachbarte Zellen reduziert werden. Dafür wird Callose durch entsprechende Synthesen direkt in die Plasmodesmen synthetisiert. Eine Diffusion der Salze wird so erschwert (Cui und Lee, 2016). Einen weiteren Kompensationsmechanismus stellt der aktive Transport von Na⁺-Ionen aus dem Cytoplasma dar. Diese können zur Kompartimentierung in das Xylem oder zur Speicherung in die Vakuolen gepumpt werden (Zhu, 2002). Über das Xylem gelangen sie bis in die Blätter. Hier verfügen Pflanzen, wie z.B. der Strandflieder (*Limonium vulgare*), über Drüsen, mit denen sie aufgenommene Salze aktiv an die Umwelt zurückgeben können. Dagegen werden bei der Strand-Aster (*Aster tripolium*) Stengelblätter nach dem Erreichen einer kritischen Konzentration abgeworfen.

1.3.2 Trockenstress

Neben dem Verschließen der Spaltöffnungen ist die vermehrte Synthese von kompatiblen Soluten im Cytoplasma eine bewährte Überlebensstrategie bei Trockenstress. Diese Solute sind osmotisch wirksame Aminosäuren wie Prolin oder Zucker, wie Fructose oder Maltose. Diese Substanzen halten den Wassertransport aus dem Boden in die Wurzeln aufrecht, verhindern Denaturierungen von Enzymen und stabilisieren die Membran. Sie wirken sich auch in hohen Konzentrationen nicht negativ auf zellulären Abläufe aus (Park *et al.*, 2016).

1.4 Hormonelle Regulation

Die Phytohormone Gibberellinsäure (GA) und Abscisinsäure (ABA) sind wichtige Regulatoren in der Entwicklung von Pflanzen, die häufig als Gegenspieler agieren. GA hat einen positiven Einfluss auf Höhenwachstum, Samenkeimung, Blattwachstum, Blüten- und Fruchtentwicklung (Swain und Singh, 2005). Dagegen wirkt ABA wachstumsinhibierend. Sie fördert Prozesse wie Samen- und Embryoentwicklung, Wurzelwachstum oder die Toleranz gegenüber biotischem und abiotischem Stress (Finkelstein *et al.*, 2002). Speziell die Reaktion von Pflanzen auf Salzstress geht einher mit einer Unterdrückung der GA-Biosynthese (Kim *et al.*, 2008).

Die Wechselwirkung dieser beiden Phytohormone wirkt sich teilweise direkt auf Mitglieder der GRAS-Protein-Familie aus. Es handelt sich um eine Gruppe von Transkriptionsfaktoren, die auf verschiedenen Ebenen der Signaltransduktion und Entwicklung von Pflanzen involviert zu sein scheinen (Ziemer, 2008). Das Akronym GRAS leitet sich von den ersten in *A. thaliana* identifizierten Mitgliedern ab: GA INSENSITIVE (GAI), REPRESSOR of GA1 (RGA) und SCARECROW (SCR).

Alle GRAS-Proteine vereint ein hoch konservierter C-Terminus und ein variabler N-Terminus. Dazwischen befinden sich zwei Leucin-reiche Regionen mit einer Länge von jeweils 100 Aminosäuren. Zusammen bilden sie eine für Transkriptionsfaktoren typische Leucin-Zipper-Domäne. Diese dimerisiert und bindet an das negativ geladene Phosphatrückrad der DNA. Dort kann das Protein die Expression der jeweiligen Zielgene beeinflussen (Ziemer, 2008).

Neueste Genomkonstruktionen deuten auf 33 GRAS-Gene in *A. thaliana* und 106 in der Gattung *Populus* hin (Liu und Widmer, 2014). Diese deutlich erhöhte Anzahl ist auf eine Vielzahl von Tandem- und Segment-Duplikationen im Pappelgenom zurückzuführen (Tuskan *et al.*, 2006).

1.5 GRAS-Protein *SCL7*

In einer vorangegangenen Studie wurde das Gen *SCL7* aus *P. euphratica* (*PeSCL7*) in *A. thaliana* überexprimiert (Ma *et al.*, 2010). Diese Pappelart ist für ihre besondere Salz- und Trockenstresstoleranz bekannt. Die Versuche deuten darauf hin, dass *PeSCL7* zu diesen Toleranzen zumindest beiträgt. Die transgenen Linien zeigten, im Vergleich zum Wildtyp, ein anhaltendes Wurzelwachstum und ein längeres Überdauern unter der Einwirkung von Salz- bzw. Trockenstress.

1.6 Ausgewählte Gene

Die Versuche von Ma *et al.* (2010) zeigten bei *35S-PeSCL7*-Pflanzen eine signifikant erhöhte Expression der α -Amylase-1 (*AMY1*) sowie eine reduzierte Expression von *SCL4*. *SCL4* und *SCL7* scheinen gegenläufig zueinander reguliert zu sein. So führte die Überexpression von *SCL7* zu einer reduzierten Expression von *SCL4*.

Für die vorliegende Arbeit standen zwei transgene *P. × canescens*-Linien zur Verfügung, die bereits mit *SCL7* unter der Kontrolle eines *35S*-Promotor transformiert wurden. Auf mögliche Toleranzen wurden diese Linien bisher nicht untersucht. Einzige bekannte Abweichungen vom Wildtyp ist ein signifikant erhöhter Cellulosegehalt bei sechs Pflanzen der Linie N329 (Tabelle 2; Brüggmann, 2017).

Tabelle 2: **Prozentualer Cellulosegehalt des Stengelgewebes von N329-4, N329-6 und P1.** Am Fraunhofer Institut für angewandte Polymerforschung durchgeführte Untersuchung auf Asche, Cellulose, Ethanol Extraktstoffe, Hemicellulose, Lignin und Protein. Signifikante Abweichung (*) des Cellulosegehalts. Die Ergebnisse basieren auf der Analyse von drei Individuen (Brüggmann, 2017).

Bestandteile	Transgen (N329-4)			Transgen (N329-6)			<i>P. × canescens</i>	
	\bar{x}	s	p	\bar{x}	s	p	\bar{x}	s
Cellulose	35,5	1,0	0,03*	34,5	0,6	0,03*	32,3	0,7

1.6.1 α -Amylase

Dieses Enzym hydrolysiert die in den Chloroplasten in Form von Stärke (Amylose) gespeicherten Polysaccharide an ihren α -1-4-glykosidischen Bindungen. Diese Disaccharide (Maltose) sind die vorherrschende Form des Kohlenstoffs, die aus den Chloroplasten in das Cytoplasma gelangen. Im Fall der Maltose geschieht dies über das Maltose Exzess Protein 1 (*MEX1*) (Niittylä *et al.* 2004). Maltose steht in mehreren Arbeiten in Verbindung mit der Reaktion von Pflanzen auf externen Salzstress (Lu und Sharkey, 2006; Kempa *et al.*, 2008). So zeigten Metabolitenanalysen von Kempa *et al.* (2008), dass anhaltender Salzstress in *A. thaliana* zu einer signifikanten Erhöhung der intrazellulären Maltosekonzentration führt. Der Glucosegehalt blieb dabei annähernd konstant.

Kaplan und Guy (2004) schlagen vor, dass Maltose durch seine hydrophilen Gruppen im Cytoplasma als kompatibles Solut agiert. Damit hätte es einen positiven Einfluss auf das Überdauern der Pflanze bei Hitze- und Kälteeinwirkungen oder osmotischem Stress.

1.6.2 Na^+/H^+ -Antiporter

Ein vermehrtes Eindringen von Natrium kann in den Zellen bis zu einem gewissen Grad aktiv ausgeglichen werden. Möglich ist dies durch Kompartimentierung und Speicherung der Na^+ -Ionen in den Vakuolen der Zellen und deren Überführung aus dem Cytoplasma in das Xylem. Beide Mechanismen werden durch den salt-overly-sensitive-Signalweg (*SOS*) initiiert (Zhu, 2002). Ausgelöst wird dieser durch eine Zunahme von Ca^{2+} -Ionen im Cytoplasma, hervorgerufen durch Salzstress. Dabei ist nicht bekannt, wie sich dieses Calciumsignal von anderen Stressoren wie Trockenheit, Schwermetallen, Hitze oder Kälte unterscheidet (Yuan *et al.*, 2014). An die Ca^{2+} -Ionen bindet das EF-Hand-Motiv tragende *SOS3*-Protein. Dieses Helix-Loop-Helix-Motiv bindet Ca^{2+} -Ionen. Dadurch verändern sich Konformation und Funktion des Proteins. In dieser Form aktiviert es anschließend die Serin/Threonin-Proteinkinase *SOS2*. Diese phosphoryliert und aktiviert den in der Plasmamembran lokalisierten Na^+/H^+ -Antiporter *SOS1* und *NHX* (Na^+/H^+ -Exchanger) an der Vakuole (Zhu, 2002).

1.6.3 Transkriptionsfaktor *SCL4*

Über die regulatorische Funktion des GRAS-Proteins *SCL4* ist wenig bekannt. Aufgrund der großen strukturellen Ähnlichkeit zu *SCL7* (Abbildung 1) und der bereits beschriebenen gegensätzlichen Expression wurde es in die Expressionsanalysen dieser Arbeit übernommen.



Abbildung 1: **Phylogenetischer Baum von *SCL7* und *SCL4*.**

Jedes Gen weicht in seiner Sequenz um 4,9% von der des anderen ab. Insgesamt unterscheiden sich die Sequenzen der Gene um 9,8%. (Erstellt mit MegAlign Pro™, DNASTAR Inc., Madison, USA und der Alignment Software MUSCLE)

1.6.4 Cellulose-Synthasen

Die Zellwände von Pflanzen bestehen überwiegend aus den Polysacchariden Cellulose, Hemicellulose und Pektin. Den größten Anteil hat dabei die Cellulose. Sie wird von membranständigen Cellulose-Synthasen in Form von langen Ketten aus β -1,4-glycosidisch verknüpften D-Glucose-Molekülen gebildet. Diese Ketten setzen sich zu Mikrofibrillen zusammen, die durch intra- und intermolekulare Wasserstoffbrückenbindungen und Van-der-Waals-Kräfte verbunden sind. Die Lücken zwischen den Mikrofibrillen werden mit Pektin und Hemicellulose aufgefüllt. Die so gebildete, primäre Zellwand enthält zudem Proteine und andere chemische Verbindungen (McFarlane *et al.*, 2014).

Während die primäre Zellwand durch ihre Elastizität gemeinsam mit der Zelle wächst, wird die sekundäre erst nach Erreichen ihrer endgültigen Größe gebildet. Den größten Anteil an der Gesamtbioasse eines Baumes hat die sekundäre Zellwand von Xylemzellen. Dabei macht die Cellulose bis zu 50% aus (Suzuki *et al.*, 2006). Endler *et al.* (2015) bringen eine anhaltende Cellulose-Synthese in Verbindung mit einer erhöhten Toleranz gegenüber Salzstress. Dieser Zusammenhang und der von Brüggmann (2017) festgestellte erhöhte Cellulosegehalt einer in dieser Arbeit verwendeten transgenen Linie machen die Cellulose-Synthase zu einem interessanten Kandidaten für die Vermittlung einer Salz- und Trockenstresstoleranz.

1.7 Callose-Synthase

Bei Callose handelt es sich um Ketten von β -1,3-glykosidisch verknüpften D-Glukose-Molekülen. Sie werden von membranständigen Synthasen in die Zellzwischenräume, den Plasmodesmen, synthetisiert und senken so deren Permeabilität. Damit können Pflanzen eine Ausbreitung von egedrungenen biotischen oder abiotischen Stressfaktoren auf umliegende Zellen begrenzen. Induziert wird die Callosesynthese durch veränderte Ionenkonzentrationen, reaktive Sauerstoffspezien oder Phytohormone (Rejeb *et al.*, 2014).

1.8 Zielsetzung

In dieser Arbeit soll geprüft werden, ob eine Überexpression von *SCL7* in *P. × canescens* zu einer erhöhten Toleranz gegenüber Salz- und Trockenstress führt. Zur Überprüfung werden die von Brüggmann (2017) mit *SCL7* transformierten Pflanzen, gemeinsam mit dem Wildtyp, gezielt diesen Stressfaktoren ausgesetzt. Der Einfluss von *SCL7* wird makroskopisch durch Phänotypisierung und auf molekularer Ebene durch Expressionsanalysen der hier beschriebenen Gene untersucht.

2. Material und Methoden

2.1 Datenbanken

Phytozome

Vom Energieministerium der Vereinigten Staaten von Amerika bereitgestellte Datenbank für Pflanzengenome. In dieser Arbeit genutzt für Genanalysen von *A. thaliana* und *P. trichocarpa*.

(<http://www.phytozome.net/poplar>)

AspenDB

Frei verfügbare Datenbank. Enthält die Genome von *P. trichocarpa* und *P. × canescens*. Letzteres wurde nicht vollständig sequenziert, sondern durch Einfügen bekannter genetischer Varianten in das Genom von *P. trichocarpa* erstellt.

(<http://aspendb.uga.edu>)

2.2 Material

2.2.1 Chemikalien

Soweit nicht anders aufgeführt, stammen die verwendeten Chemikalien mit den Reinheitsgraden „reinst“, „zur Analyse“, „molecular biology grade“ und „for molecular biology“ von den Firmem AppliChem (Darmstadt), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) und Sigma Aldrich (München).

Bei beiden Linien wurde P1 mit dem Genkonstrukt *35S-SCL7* transformiert (Brüggmann, 2017). Die *SCL7*-Sequenz für das Konstrukt stammt aus dem Genom von *P. trichocarpa*. Durch die geringe Varianz von *SCL7* (Abbildung 2) können die Erkenntnisse von Ma *et al.* (2010) in Bezug auf die Verleihung einer Salz- und Trockenstresstoleranz durch die Überexpression von *SCL7* aus *P. euphratica* (*PeSCL7*) in *A. thaliana* auch auf *PcSCL7* und *PtSCL7* übertragen werden.

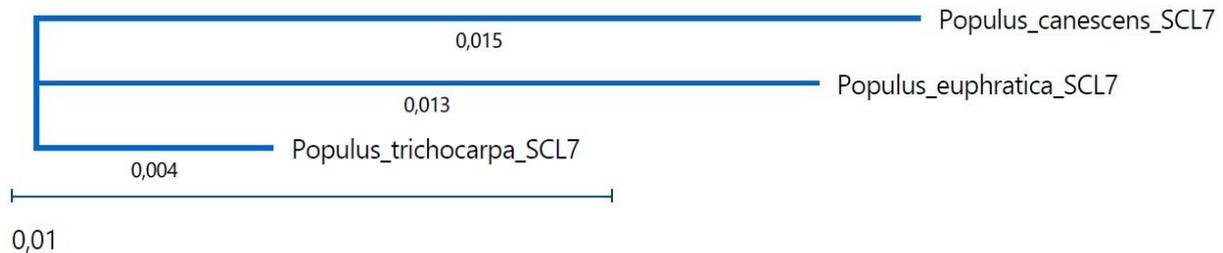


Abbildung 2: **Phylogenetischer Baum der *SCL7*-kodierenden Sequenzen von *P. trichocarpa*, *P. × canescens* und *P. euphratica*.**

Die Sequenzen der drei Arten unterscheiden sich zu 1,7-1,9%. (Erstellt mit MegAlign Pro™, DNASTAR Inc., Madison, USA und der Alignment Software MUSCLE)

Aus einem vorangegangenen Praktikum standen Pflanzen der Linien P1 und N340-6 zur Verfügung, die zu Beginn dieser Arbeit vier Monate auf 0,1 M NaCl-Medium kultiviert wurden. Berücksichtigt wurden sie bei der Planung der in dieser Arbeit durchgeführten Salztoleranzversuche und bei Expressionsanalysen.

2.2.5 Primer

Die in dieser Arbeit verwendeten Primer (Tabelle 3) wurden speziell für qRT-PCR-Untersuchungen entworfen. Die Synthese erfolgte durch Eurofins MWG GmbH (Ebersberg). Um eine Verfälschung der Ergebnisse durch genomische DNA zu vermeiden, wurden Primer, soweit es möglich war, über Exon-Exon-Grenzen gelegt.

Die in dieser Arbeit untersuchten Gene stammen aus den folgenden Studien:

<i>AMY1</i> und <i>SCL4</i>	von Ma et al. (2010)
<i>SOS1-3</i>	von Tang et al. (2010)
<i>CaIS1</i> und <i>CaIS8</i>	von Cui und Lee (2016)
<i>CesA12</i> und <i>CesA14</i>	von Suzuki et al. (2006)

Das Forschungsobjekt der hier aufgeführten Studien war *A. thaliana*. Um die Gene auf *P. × canescens* übertragen zu können wurden zunächst die kodierenden Sequenzen aus *A. thaliana* über einen BLAST-Algorithmus (Phytozome) mit denen aus dem Genom von *P. trichocarpa* verglichen. Aus den so ermittelten Genen wurden potentielle Primer ausgewählt, die anschließend mit dem Genom von *P. × canescens* abgeglichen wurden (AspenDB). Der Umweg über das *P. trichocarpa*-Genom empfiehlt sich, da die Phytozome-Datenbank zusätzliche Informationen, wie die Intron-Exon-Verteilung, bereithält.

Material und Methoden

Tabelle 3: **Verwendete Primer.**

Exon-Exon-Übergänge sind mit ^ markiert, unterschiedliche Nukleotide zwischen *SCL4* und *SCL7* mit roten Buchstaben. *CesA12* und *CesA14* sind sich in Sequenz und Expressionslevel sehr ähnlich, daher wurde für beide Gene ein gemeinsames Primerpaar entworfen. Die die paralogen Gene *SOS1-SOS3* werden von jeweils einem Primerpaar berücksichtigt. Für die Gene *SCL7* und *CesA7* lagen aus vorhergehenden Untersuchungen am TI bereits angepasste Primer vor.

Kürzel	Gen	Primäres Transkript	Primer 5'-3'	
<i>AMY1</i>	ALPHA-AMYLASE-1	Potri.002G126300.1	Forward	GCACCGCAAG^GATATATGCC
			Reverse	GGGGCTTTCCATCAGAAGG
<i>CalS1</i>	CALLOSE SYNTHASE 1	Potri.001G230000.1	Forward	ACTCCCTCACATGACAATACG
			Reverse	CT^GATTGCACAGGCCTGCAA
<i>CalS8</i>	CALLOSE SYNTHASE 8	Potri.011G095100.2	Forward	GCCCTTGCTGACACAGATAG
			Reverse	G^AGATTAAGCTGCTGTGGCA
<i>CesA7</i>	CELLULOSE SYNTHASE A7	Potri.006G181900.1	Forward	AACGTCGAGCTATGAAGAGAG
			Reverse	GGTGGATCATGCAAGATGGG
<i>CesA12/ CesA14</i>	CELLULOSE SYNTHASE A12	Potri.006G052600.1	Forward	CTGCCACCCAGAGTCTC
	CELLULOSE SYNTHASE A14	Potri.016G054900.4	Reverse	TGGGGAAGTGAA^ATAGGATGG
<i>SCL4</i>	SCARECROW-LIKE 4	Potri.007G026300.1	Forward	GAGGGTCAGAGGAAATTGTAC
			Reverse	GTTGGTTAAGTTCAAGGACTCG
<i>SCL7</i>	SCARECROW-LIKE 7	Potri.005G123800.1	Forward	TGGCTAAATCGTTGAACCCGAG
			Reverse	GAACCGGGTCGGGTACTTGA
<i>SOS1</i>	SALT-OVERLY-SENSITIVE 1	Potri.008G140700.1	Forward	CTATGTGATTGGAAGGGCTTG
		Potri.010G100900.1	Reverse	GAGGCTTGAATCTGCATGCTA
<i>SOS2</i>	SALT-OVERLY-SENSITIVE 2	Potri.018G130500.6	Forward	GTTCTGGAG^GTTTATGAAGTTGC
		Potri.006G068400.1	Reverse	CTGGGGAAACTCTTGAATATCAC
<i>SOS3</i>	SALT-OVERLY-SENSITIVE 3	Potri.015G013100.2	Forward	GATGATGGGCTTATTCACAAG^G
		Potri.012G015100.1	Reverse	GGAGAATTTGTTTCGATCTTTGGG

2.2.6 Expression der ausgewählten Gene

Um Informationen über das Expressionslevel einzelner Gene in unterschiedlichen Geweben zu erhalten, wurde der im Internet zu Verfügung stehende Electronic Fluorescent Pictograph (eFP) – Browser genutzt (Abbildung 3, Tabelle 4)). Dieser stellt die Expressionslevel von Genen in *P. trichocarpa* graphisch und tabellarisch dar (<http://bar.utoronto.ca/efppop/cgi-bin/efpWeb.cgi>).

Material und Methoden

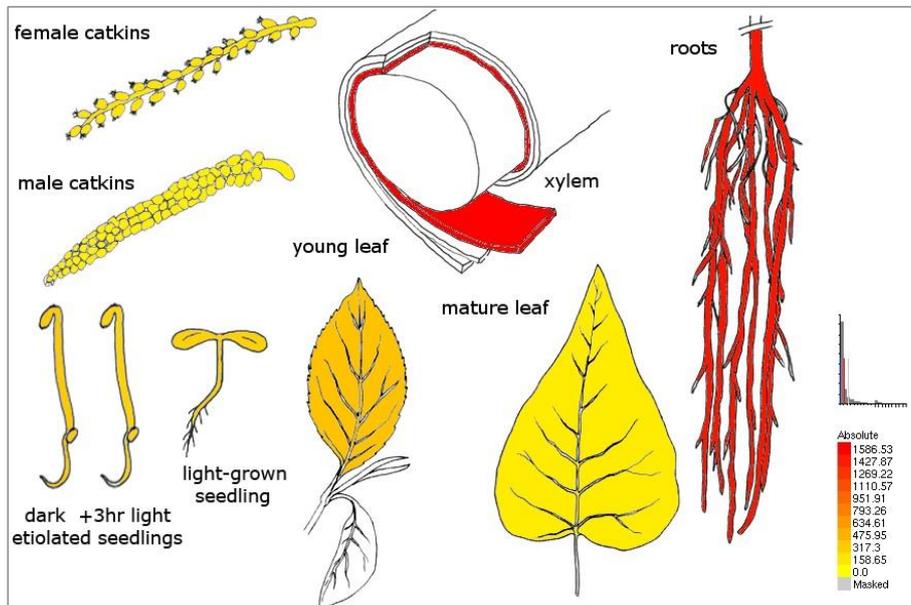


Abbildung 3: **Beispielhafte Ergebnispräsentation des Poplar eFP Browsers, Expression von Potri.005G123800.1 (SCL7).**

Zu erkennen ist eine hohe Expression in Xylem- und Wurzel-Gewebe. (Zugriff am 15.04.17)

Bei der Wahl der Gene wurde geprüft, ob diese in Geweben junger Pappeln exprimiert werden. Im Fokus stand dabei die Expression in Wurzel- und Xylem-Gewebe. Da bei späteren Analysen die relativen Expressionsunterschiede berücksichtigt wurden, waren die Absoluten bei der Wahl nicht entscheidend.

Tabelle 4: **Absolute Expressionslevel.**

(Zugriff am 10.03.17)

Gen	Transkript (primär)	Absolutes Expressionslevel	
		Wurzel	Xylem
α -AMYLASE-1	Potri.002G126300.1	56,13	39,26
CALLOSE SYNTHASE 1	Potri.001G230000.1	9536,79	105,43
CALLOSE SYNTHASE 8	Potri.011G095100.1	85,50	7,63
CELLULOSE SYNTHASE A12	Potri.006G052600.1	1961,43	7534,40
CELLULOSE SYNTHASE A14	Potri.016G054900.4	2522,76	3401,46
CELLULOSE SYNTHASE A7	Potri.006G181900.1	3042,03	58423,69
SCARECROW-LIKE 4	Potri.007G026300.1	3608,50	1875,53
SCARECROW-LIKE 7	Potri.005G123800.1	1464,13	1586,53
SALT-OVERLY-SENSITIVE 1	Potri.008G140700.1	310,50	255,00
SALT-OVERLY-SENSITIVE 2	Potri.018G130500.6	Keine Daten verfügbar	
	Potri.006G068400.1		
SALT-OVERLY-SENSITIVE 3	Potri.015G013100.2	166,00	405,16
	Potri.012G015100.1	261,66	181,93

2.3 Methoden

2.3.1 Gewebekultur

2.3.1.1 Kultivierung

Alle Pflanzen wurden unter den gleichen, konstanten Bedingungen kultiviert. Genutzt wurde dafür ein Klimaraum, in dem eine Temperatur von 23 °C und eine relative Luftfeuchtigkeit von 50% herrschte. Soweit nicht anders erwähnt, wurden die Pflanzen rund um die Uhr mit einer Photonen-Flussdichte (PFD) von 20-25 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ beleuchtet.

Jedes Medium basierte auf einem Grundmedium aus Saccharose und Woody Plant Medium von Duchefa Biochemie, einem Basismedium, welches Vitamine, Mikro- und Makronährstoffe enthält (Tabelle 5).

Tabelle 5: **Zusammensetzung des Grundmedium (460-Medium)**

Komponente	Konzentration
Saccharose	10 g/L
Agar	6 g/L
Woody Plant Medium (Duchefa Biochemie)	2,463 g/L
pH (HCl bzw. NaOH) 5,8	

Als Kultivierungsgefäße wurden Magenta™ Dosen aus Polypropylen von Sigma-Aldrich verwendet. Diese wurden leer autoklaviert und anschließend mit jeweils ca. 80 mL ebenfalls autoklavierten Kultivierungsmedien befüllt. Alle Arbeiten mit *in vitro*-Kulturen wurden an Sicherheitswerkbänken durchgeführt.

2.3.1.2 Test auf Salztoleranz

Vorversuche haben gezeigt, dass *P. × canescens* bis zu vier Monate auf 460-Medium mit 0,1 M NaCl überdauern kann (Daten hier nicht enthalten). Für Folgeversuche wurden daher Konzentrationen von 0,05 M, 0,1 M und 0,15 M NaCl festgelegt. Die Zugabe von NaCl erfolgte bei der Zubereitung der Medien vor der Einstellung des pH-Werts.

Für den Versuch wurden Pflanzen der transgenen Linien und des Wildtyps, mit ähnlicher Wuchshöhe und äußerem Erscheinungsbild gewählt. Diese wurden auf die neuen Medien verteilt, wobei die Wurzeln auf ca. 0,5 cm gekürzt wurden.

Zur Analyse der Auswirkung von kurzzeitigem Salzstress wurde 0,15 M 460-Medium ohne Agar angesetzt und autoklaviert. Als Kultivierungsgefäße wurden transparente 10 mL Schraubröhren aus Polypropylen (Sarstedt) verwendet. Die Pflanzen wurden mit Wurzeln in Schraubröhren überführt und mit 2 mL 460-Flüssigmedium befüllt. Nach drei Tagen erfolgte ein Wechsel auf 2 mL 0,15 M NaCl-Flüssigmedium. Nach sechs, zwölf und 24 Stunden wurden pro Sublinie

jeweils zwei Pflanzen geerntet. Wurzeln, Stengel und Blätter wurden zur späteren Verarbeitung voneinander getrennt und durch flüssigen Stickstoff tiefgefroren.

2.3.2 Test auf Trockenstress

Zur Simulation von Trockenstress wurde 460-Medium mit Polyethylenglycol (PEG 400) versetzt. Da eine Autoklavierung nicht möglich war, wurde es steril filtriert (Porengröße 0,2 μm). PEG wirkt stark hygroskopisch. Es bindet einen Teil des Wassers im Medium und setzt so dessen Verfügbarkeit für die Pflanze herab. Vorversuche zeigten, dass Pflanzen auf einem Nährmedium mit 5% (v/v) PEG nicht überleben. Bei 2,5% (v/v) waren Anzeichen von Stress deutlich zu erkennen. Reine Kopfstecklinge bildeten bei Konzentrationen ab 2,5% (v/v) PEG keine Wurzeln aus. Für den Hauptversuch wurden Konzentrationen von 1, 5, 2 und 2,5% (v/v) gewählt und die Pflanzen mit Wurzeln überführt. Diese wurden, wie bei dem Test auf Salztoleranz, auf etwa 0,5 cm gekürzt.

Zur Überprüfung der Auswirkungen von kurzzeitigem Trockenstress wurden Pflanzen, mit Wurzeln und einem mit 400 μL Leitungswasser befeuchteten Filterpapier (\varnothing 70 mm) in Petrischalen überführt. Diese standen abgedunkelt bei einer PFD von 1-1,5 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Nach sechs Stunden wurden jeweils zwei Pflanzen von jeder Sublinie und des Wildtyps geerntet. Wurzeln und Stengel wurden zur späteren Verarbeitung getrennt und durch flüssigen Stickstoff tiefgefroren.

2.3.3 Bestimmung der Wurzel-Biomasse

Pflanzen der Trocken- und Salzstressversuche wurden nach sechs Wochen auf Unterschiede der gebildeten Wurzellänge und -masse untersucht. Dafür wurden sie aus dem Medium entfernt und durch Abtupfen mit Zellstoff von anhaftendem Wasser und Medienresten befreit. Die vom Stengel getrennten Wurzeln wurden in 1,5 mL Reaktionsgefäße überführt, die zuvor für fünf Stunden bei 50 °C getrocknet und anschließend gewogen wurden. Die Biofeuchtmasse ergab sich durch das Wiegen unmittelbar nach der Ernte, die Trockenmasse nach achtstündigem Trocknen bei 50 °C.

Für die Auswertung wurde bei dem Salzstressversuch die Masse aller gebildeten Wurzeln pro Pflanze berücksichtigt. Bei dem Trockenstressversuch dagegen die Masse von nur einer Wurzel pro Pflanze, deren Länge für die Ermittlung einer längenbezogenen Masse ebenfalls bestimmt wurde.

2.3.4 RNA

Die Lebensdauer von mRNA ist selbst in einer vitalen Zelle sehr begrenzt. Auch während und nach der Extraktion unterliegt sie der ständigen Gefahr von ubiquitär vorkommenden RNasen abgebaut zu werden. Aus diesem Grund wurde das Pflanzenmaterial unmittelbar nach der

Ernte durch flüssigem Stickstoff auf -196 °C gekühlt. Verwendet wurden ausschließlich Nuklease-freie Materialien und Flüssigkeiten. Gelagert wurde die RNA bei -70 °C.

2.3.4.1 Extraktion

Die im TI angepassten Protokolle für RNA-Extraktion basieren auf Chang *et al.* (1993) (Tabelle 6). In 2 mL-Reaktionsgefäßen wurde etwa 100 mg Pflanzenmaterial zusammen mit zwei gebackenen Stahlkugeln in flüssigem Stickstoff tiefgekühlt. Eine Retsch®-Schwingmühle homogenisierte das Material mit Schwingungen von 17-19 Hz in 2-3 Minuten zu einem feinen Pulver. Die Auflösung von Zellmembran- und Zellwandbestandteile erfolgte durch Zugabe von 1 mL vorgewärmten Extraktionspuffer und einer Inkubation von 10 min bei 65°C und 400 rpm.

Tabelle 6: **Extraktionspuffer nach Chang *et al.* (1993)**

Komponente	Konzentration
CTAB (Hexadecyltrimethylammoniumbromid)	2% (w/v)
PVP (Polyvinylpyrrolidinon, K30)	2% (w/v)
Tris-HCl, pH 8	100 mM
EDTA	25 mM
NaCl	2 M
RNase-freies Wasser	Gesamtvolumen: 500 mL

Die Proben wurden anschließend durch Vortexen homogenisiert und bei Raumtemperatur mit 16500 *g* für 20 min zentrifugiert. Dabei setzte sich die RNA in der oberen wässrigen Phase ab. Diese wurde in ein neues 2 mL-Reaktionsgefäß überführt und mit einem Volumen Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) versetzt. Gemischt wurde durch Invertieren bis eine homogene Emulsion entstand. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Waschschrift wiederholt. Abschließend wurde die wässrige Phase in ein neues 1,5 mL-Reaktionsgefäß überführt und die RNA mit 1/3 Volumen Lithiumchlorid über Nacht bei 4 °C gefällt.

Am Folgetag wurde die RNA für 20 min bei 4 °C und 18000 *g* ab zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 200 µL SSTE-Puffer (Tabelle 7) für 2-3 min bei 65 °C resuspendiert. Es folgte ein weiterer Waschschrift mit 1 Volumen Chloroform-Isoamylalkohol. Die Phasen wurden durch Zentrifugieren bei 4 °C und 16500 *g* getrennt und die wässrige in ein neues 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt. Gefällt wurde die RNA durch Zugabe von zwei Volumen absolutem Ethanol und 35 µg Glycogen über Nacht.

2.3.4.4 Bioanalyser

Verwendet wurde ein 2100 Bioanalyser von Agilent Technologies, Santa Clara, USA. Dieser arbeitet mit einer Lab-on-Chip-Technologie. Die aufgetragenen Proben wandern auf den Chips durch Mikrokanäle und werden in einen Trennkanal eingespritzt. Dort werden die einzelnen Probenkomponenten elektrophoretisch getrennt und durch eingelagerte Fluoreszenzfarbstoffe detektiert. Deren Größe wird durch einen ebenfalls aufgetragenen Größenstandard (Ladder) ermittelt. Das Ergebnis wird von einer Software (2100 Expert) in gelartige Bilder und Elektropherogramme übersetzt.

Die Qualität der RNA wird durch den RIN-Wert (RNA integrity number) angegeben. Dieser wird automatisch generiert und ausgedrückt durch einen Zahlenwert von 1-10. Ein Wert von 10 steht für die höchste zu erreichende Qualität. Die RNA ist intakt, weder degradiert noch fragmentiert. Ein Wert von 1 steht entsprechend für die geringste Qualität. Ermittelt wird der RIN-Wert durch einen internen Algorithmus. Über diesen ist bekannt, dass er die Fläche unter der 28S- und 18S-rRNA mit der der Fläche unter dem gesamten Graphen in ein Verhältnis bringt. Da die beiden großen ribosomalen Untereinheiten die größten Fraktionen der Gesamt-RNA darstellen, sollte dieser Wert möglichst groß sein. Die Fläche unter dem 28S-Peak sollte zudem doppelt so groß sein wie die unter dem 18S-Peak.

Des Weiteren wird die Höhe des 28S-Peaks berücksichtigt. Während ein hoher und schmaler Peak für eine hohe Qualität steht, deutet ein verbreiteter und niedrigerer Peak auf eine Degradierung der rRNA hin. Ähnlich verhält es sich mit dem Peak des zugegebenen, internen Markers. Seine Höhe sollte in allen Proben gleich sein. Er ist erhöht, wenn ein größerer Teil der rRNA zu kleineren Fragmenten degradiert ist. (Anonymous, 2002; Becker *et al.*, 2009)

2.3.5 qRT-PCR

Als analytisches Verfahren wurde eine relative Quantifizierung angewendet. Dabei wurde die Expression des Zielgens auf ein Housekeeping Gen (HKG) bezogen, welches in seiner Aktivität keiner Regulation unterliegt. Die in dieser Arbeit durchgeführten Analysen beziehen sich auf Ubiquitin, da es in allen Phasen des Zellzyklus annähernd gleich stark exprimiert wird.

Das eigentliche Messverfahren beruht auf der zeitlichen Erfassung der Fluoreszenzzunahme. Verwendet wurde dafür ein Ready-to-Use Master Mix (innuMix SyGreen) von Analytik Jena AG. Dieser enthielt neben einem interkalierenden Farbstoff u.a. noch eine Taq-Polymerase und dNTP's.

Die Quantifizierung der Startmenge wurde über den CP-Wert (Crossing Point) berechnet. Er entspricht der Anzahl von PCR-Zyklen, die zum Erreichen eines definierten Fluoreszenzniveaus nötig sind. Dabei wurde eine PCR-Effizienz von 100% angenommen, was einer Verdopplung der DNA-Produktmenge mit jedem Zyklus entspricht. Diese dürfte auch unter optimalen

Bedingungen nur selten erreicht werden. Da die Bedingungen aber für alle Proben gleich waren und sich so relativierten, wurde die Abweichung von der wahren Effizienz nicht weiter berücksichtigt. Der CP wurde von der BIORAD Analysesoftware automatisch festgelegt.

$$\Delta CP = CP_{Zielgen} - CP_{Housekeeping\ Gen} \quad (1)$$

$$\Delta\Delta CP = \Delta CP_{Behandlung} - \Delta CP_{Kontrolle} \quad (2)$$

$$Ratio = 2^{-\Delta\Delta CP} \quad (3)$$

Die Ergebnisse konnten durch manuelle Berechnungen nachvollzogen werden. Dabei wurde nach dem obenstehenden Schema vorgegangen. Mit *Formel 1* wurde die Startmenge des Zielgens durch die des *HKG* relativiert. *Formel 2* unterscheidet zwischen behandelten, also transformierten Individuen und der Kontrolle, einem Wildtyp. Die Stärke der Expression wird mit *Formel 3* berechnet. Eine Basis von 2 entspricht einer Verdopplung mit jedem Zyklus (Pfaffl *et al.*, 2004).

Der Reaktionsansatz bestand für jede Probe aus 10 μ L innuMix SyGreen (2 \times), jeweils 1 μ L Forward- bzw. Revers-Primer (5 μ M), 4 μ L HPLC-Wasser und 4 μ L cDNA (50 ng μ L⁻¹).

Thermoprofil:

95°C	2:30 min	Enzymaktivierung
95°C	0:10 min	Denaturierung
55°C	0:10 min	Primeranlagerung
60°C	0:30 min	Replikation
95°C	0:10 min	Denaturierung
60°C	0:10 min	Finale Replikation
65-95 °C	5:00 min	Schmelzkurve mit 0,5 °C / 0:05 min
95°C	0:10 min	Finale Denaturierung
4°C	∞	Kühlung

2.3.6 Fehlerrechnung

Expressionsanalysen

Die Ergebnisse von mehreren Expressionsanalysen wurden miteinander verglichen. Möglich war dies durch eine gleiche Vorbereitung der einzelnen Proben und der Verwendung konstanter Untersuchungsparameter. Der Fehler des Endergebnisses wurde für jede Probe manuell berechnet.

Zur Erhöhung der Genauigkeit wurde der CP von jeweils zwei technischen Replikaten bestimmt. Die Berechnung der Expression basierte auf den daraus resultierenden Mittelwerten. Für die Fehlerrechnung wurde die Messunsicherheit in Form der absoluten Abweichungen von den Mittelwerten berücksichtigt. Für *Formel 1-2* des vorherigen Kapitels setzt sich der Fehler linear fort, die absoluten Messunsicherheiten wurden aufsummiert (= Δx). Der maximale Fehler des Endergebnisses ergab sich aus der partiellen Ableitung von *Formel 4* und der absoluten Messunsicherheit Δx (Papula, 2009).

Ergebnisse

$$\Delta Ratio_{max} = \left| \frac{\partial Ratio}{\partial \Delta \Delta cp} \cdot \Delta x \right| = |-2^{-\Delta \Delta cp} \cdot \ln(2) \cdot \Delta x| \quad (4)$$

Teilweise wurden Ergebnisse der Analysesoftware des Herstellers übernommen (CFX Manager 3.1 von Bio-Rad). Dafür wurden die Expressionsstärken von zwei natürlichen Replikaten zu Mittelwerten zusammengefasst. Die von der Software berechneten Messunsicherheiten wurden in Form von Standardabweichungen angegeben. Aus diesen wurde nach folgender Formel die Standardabweichung für die gesamte Messreihe gebildet:

$$s_{\bar{z}} = \sqrt{\frac{1}{m+n-1} \left((m-1)s_{\bar{x}}^2 + (n-1)s_{\bar{y}}^2 + (\bar{x} - \bar{y})^2 \right)} \quad (5)$$

Biotrockenmassen

Zum Vergleich der ermittelten Wurzel trockenmassen wurden die Mittelwerte normiert. Dafür wurden die Mittelwerte aller Linie durch den Mittelwert der Kontrolle (P1 auf 460-Medium) dividiert. Die Standardabweichungen derart funktional verknüpfter Mittelwerte wurde nach dem Gauß'schen Fehlerfortpflanzungsgesetz für spezielle Funktionen berechnet (Papula, 2009):

$$s_{\bar{y}} = \sqrt{\left(\frac{s_{\bar{x}}}{\bar{x}} \right)^2 + \left(\frac{s_{\bar{z}}}{\bar{z}} \right)^2} \quad (6)$$

2.3.7 NanoDrop

Die Konzentration der extrahierten Nukleinsäuren wurde photometrisch bestimmt. Der zur Anwendung gekommene NanoDrop 1000 von Thermo Fisher Scientific zeichnete ein UV-Spektrum auf (230-350 nm). Für die Konzentrationsbestimmung ist die Extinktion bei 260 nm entscheidend. Diese wird mit einem Faktor multipliziert, der je nach Art der Probe variiert (50 ng/µL für dsDNA, 40 ng/µL für RNA und 33 ng/µL für ssDNA). Als Blindwert diente eine Probemessung des verwendeten Lösungsmittels (HPLC-Wasser bei RNA und 1×TE+RNase bei DNA)

Wichtigster Parameter für die Reinheit der Probe ist die Höhe des E260/E280-Verhältnisses. Als rein gelten Werte von 1,8 für DNA und 2,0 für RNA. Verunreinigungen zeichnen sich durch erniedrigte Werte aus.

3. Ergebnisse

In sechswöchigen Versuchen wurden die Einflüsse von Salz- und Trockenstress auf das Wachstum des Pappelhybriden *P. × canescens* untersucht. Verglichen wurde dabei der Wildtyp P1 mit zwei transgenen Linien, in denen *SCL7* zur Überexpression gebracht wurde. Die Phänotypisierung konzentrierte sich auf vergleichende Untersuchungen des Spross- und Wurzelwachstums. Auf molekularer Ebene wurde die Expressionsstärke von zuvor ausgewählten Genen bestimmt.

3.1 Phänotypisierung

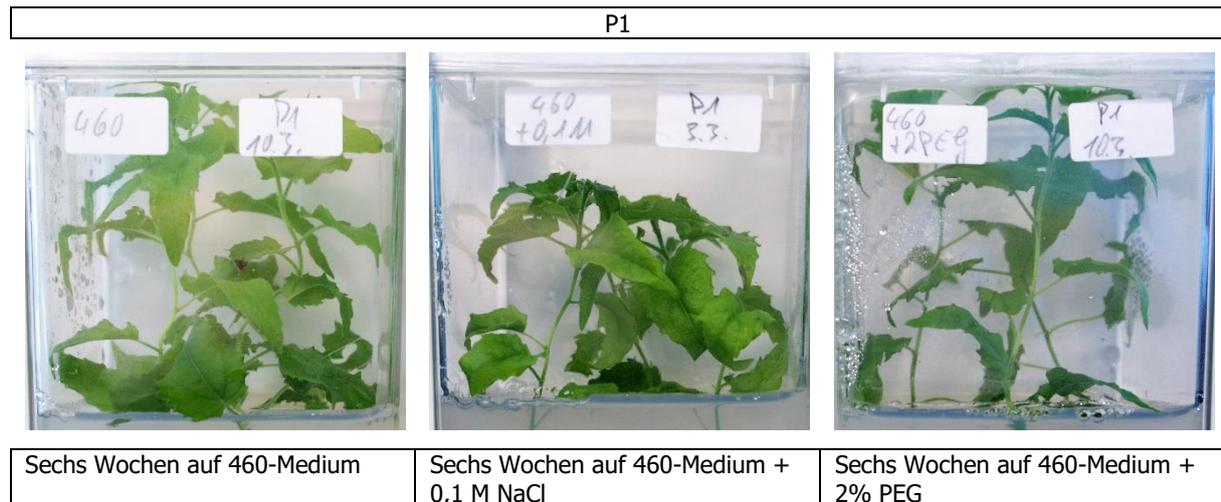
Zum Test der Pflanzen auf ihre Toleranz gegenüber Salzstress wurden diese auf Medien mit unterschiedlichen Salzkonzentrationen kultiviert (460-Medium + 0; 0,05; 0,1; 0,15 M NaCl). Dabei erwies sich ein Salzgehalt von 0,05 M NaCl als zu gering, um Unterschiede zu Pflanzen festzustellen, die auf Medien ohne Salzzusätze wuchsen. Dagegen stagnierte das Höhen- und Wurzelwachstum bei 0,15 M NaCl (Tabelle 9).

Trockenstress wurde mit PEG-Zusätzen simuliert (460-Medium + 0; 1,5; 2; 2,5% PEG). PEG ist stark hygroskopisch und reduziert dadurch das für die Pflanze verfügbare Wasser im Medium. Hier konnte bei geringem Stress (1,5% PEG) kein Unterschied zur Kontrolle ohne PEG festgestellt werden. Konzentrationen von 2,5% PEG führten zu keinem veränderten Höhenwachstum (Diagramm 3). Hier waren aber, mit verfärbten und zum Teil abgeworfenen Blättern, deutliche Anzeichen von Stress ersichtlich (Tabelle 10).

Zum Vergleich des Wachstums unter abiotischem Stress wurden jeweils die mittleren Konzentrationen von NaCl und PEG gewählt (0,1 M NaCl und 2% PEG; Tabelle 8). Unter diesen Bedingungen zeigten die Pflanzen ein anhaltendes Wurzel- und Höhenwachstum. Direkte Anzeichen, die auf die Anwesenheit von Stress gedeutet werden könnten, wurden nicht beobachtet.

Tabelle 8: **Pflanzen nach sechswöchiger Kultivierung bei einer PFD von 25 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.**

Pflanzen, die unter dem Einfluss von Salzstress standen (Mitte), wiesen ein deutlich reduziertes Höhen- und Blattwachstum auf. Trockenstress (rechts) führte zu kleineren Blättern bei gleicher Wuchshöhe. Als Vergleich diente das Wachstum ohne Stress (links). Diese wichen zum Teil von einem geraden Höhenwachstum ab, da sie nach sechs Wochen bereits zu groß für die verwendeten Kulturgefäße waren. Eine veränderte Blattfärbung konnte bei den untersuchten Linien nicht beobachtet werden.



Ergebnisse

N329-1



N329-3



N340-1



N340-6



Sechs Wochen auf 460-Medium

Sechs Wochen auf 460-Medium +
0,1 M NaCl

Sechs Wochen auf 460-Medium +
2% PEG

3.1.1 Einfluss von Licht

Für eine Erhöhung der Aussagekraft und zum Ausgleich möglicher Verluste durch Kontaminationen wurden die Salz- und Trockenstressversuche redundant angelegt. Im Klimaraum wurden jeweils zwei gleiche Sublinien-Medien-Kombinationen übereinandergestellt. Nach drei Wochen wurden Auffälligkeiten festgestellt, die auf die entstandenen unterschiedlichen Beleuchtungsstärken (PFD) zurückgeführt werden. Diese betrug $10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ in den unteren und $25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ in den oberen Gefäßen.

Pflanzen unter Salzstress

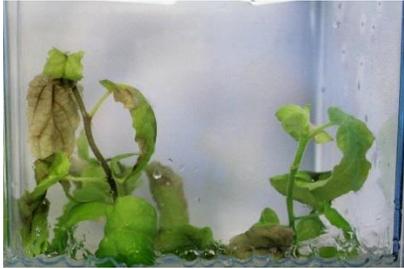
Pflanzen, die auf 0,15 M NaCl kultiviert wurden, wiesen bei einer höheren PFD deutlich mehr Anzeichen von Stress auf als in der Kontrolle darunter (Tabelle 9). Dieser zeigte sich in Form von verfärbten, teilweise bereits abgeworfenen Blättern und umgebogener Sprosse. Eine höhere Intensität der Beleuchtungsstärke scheint den entstehenden Stress der Pflanze durch die hohe Salzkonzentration im Medium zu verstärken.

Dieser Effekt war zu dieser Zeit ausschließlich bei diesen Pflanzen zu beobachten. In den drei darauffolgenden Wochen wurde die Position der Kulturgefäße und somit die Beleuchtungsstärke in Intervallen von drei bis vier Tagen getauscht.

Ergebnisse

Tabelle 9: **Einfluss von Licht auf das Wachstum von Pflanzen bei 0,15 M NaCl.**

Die linke Spalte zeigt den Zustand der Pflanzen unmittelbar nach dem Umsetzen, die rechte Spalte die gleichen Pflanzen nach drei Wochen. In der mittleren Spalte sind Pflanzen zu sehen, die in den ersten drei Wochen des Versuchs weniger Licht ausgesetzt waren als die Pflanzen in der rechten Spalte.

P1		
		
N329-1		
		
N329-3		
		
N340-1		
		
N340-6		
		
Unmittelbar nach Umsetzen	Nach drei Wochen bei einer PFD von $10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	Nach drei Wochen bei einer PFD von $25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$

Ergebnisse

Pflanzen unter Trockenstress

Auch die Anordnung der Trockenstressversuche wurde, nach dem beobachteten Einfluss der Beleuchtungsstärke auf Pflanzen mit Salzstress, alle drei bis vier Tage gewechselt. Zu diesem Zeitpunkt wiesen Pflanzen unter Trockenstress derartige Reaktionen nicht auf. Dennoch könnten die ersten drei Wochen bei konstanter Beleuchtung das Wachstum der folgenden drei Wochen beeinflusst zu haben. Entsprechende Symptome wurden erst nach sechs Wochen deutlich.

Ein Medienzusatz von 2,5% PEG führte bei allen Pflanzen zu deutlichen Anzeichen von einwirkendem Stress. Diese traten verstärkt bei Pflanzen auf, die zu Beginn geringeren Beleuchtungsstärken ausgesetzt waren. Dazu zählten deutlich mehr abgeworfene Blätter. Bei Blättern, die noch mit den Sprossen verbunden waren, fiel auf, dass sie von den Spitzen her zunächst heller wurden und zum Teil braun verfärbten (Tabelle 10).

Unter Salzstress kam es ebenfalls zu Braunfärbungen einzelner Blätter. Diese begannen aber nicht immer an den Blattspitzen, sondern auch mittig oder am Übergang von Spross zu Blatt.

Tabelle 10: **Einfluss von Licht auf das Wachstum von Pflanzen unter dem Einfluss von 2,5% PEG.**

Die Pflanzen der linken und rechten Spalte sind identisch. Die linke Spalte zeigt sie nach dem Umsetzen, die mittlere und rechte Spalte nach sechswöchiger Kultivierung. Die Pflanzen der rechten Spalte waren in den ersten drei Wochen einer höheren PFD ausgesetzt als die Pflanzen in der mittleren Spalte. Hier scheint eine höhere Beleuchtungsstärke die Auswirkungen von Trockenstress zu minimieren.

P1		
		
Unmittelbar nach Umsetzen auf 2,5% PEG-Medium	Nach sechs Wochen, die ersten drei Wochen bei einer PFD von $10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	Nach sechs Wochen, die ersten drei Wochen bei einer PFD von $25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$

Ergebnisse

N329-1



N329-3



N340-1



N340-6



Unmittelbar nach Umsetzen auf 2,5% PEG-Medium

Nach sechs Wochen, die ersten drei Wochen bei einer PFD von $10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$

Nach sechs Wochen, die ersten drei Wochen bei einer PFD von $25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$

3.1.2 Wurzelmasse

Bei der Analyse des Wachstums wurde die Wurzelmasse von Pflanzen untersucht, die sechs Wochen unter Salzstress standen. Dabei wurde jeweils die Trockenmasse aller ausgebildeten Wurzeln einer Pflanze bestimmt. Das Ergebnis deutete bei allen Linien auf eine stete Zunahme mit ansteigender Salzkonzentration hin. Diese war bei P1 auf 0,05 M sowie bei P1 und N329-3 auf 0,1 M NaCl signifikant erhöht ($p=0,21$; 0,02; 0,026) gegenüber den Kontrollen der Linien ohne Salzstress (Diagramm 1). Die transgenen Linien schienen auch ohne Salzstress mehr Wurzelmasse auszubilden, wichen allerdings nicht signifikant von P1 ab.

Um eine mögliche Veränderung des Dickenwachstums der Wurzeln feststellen zu können, wurde jeweils die längste Wurzel einer Pflanze gewählt und deren Länge und Trockenmasse bestimmt. Das Ergebnis ist eine längenbezogene Wurzelmasse, die bei den Linien N329-3 und N340-6 auch bei steigender PEG-Konzentration konstant blieb. Bei zwei Linien (N329-1 und N340-1) stieg diese jedoch an (Diagramm 2).

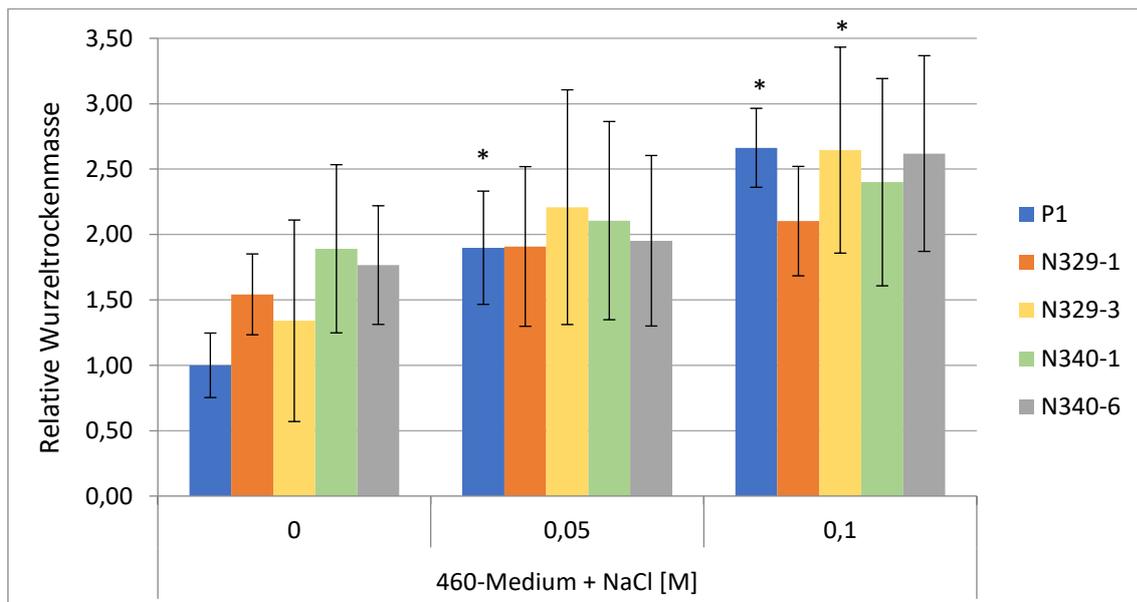


Diagramm 1: **Gesamtwurzelrockenmasse nach sechs Wochen Salzstress.**

Bei dieser Erhebung wurden von jeder Pflanze die Masse der ausgebildeten Wurzeln bestimmt. Die abgebildeten Mittelwerte setzen sich aus drei bis sechs Individuen zusammen. Zum besseren Vergleich wurden die Mittelwerte der Trockenmassen mit dem der Kontrolle (P1 auf 460-Medium) relativiert. Die transgenen Linien zeigen ohne Salzstress ein stärkeres Wurzelwachstum als P1. Pflanzen, die 0,15 M NaCl ausgesetzt waren, bildeten keine Wurzeln aus und werden nicht berücksichtigt. Die signifikanten Abweichungen (*) beziehen sich auf die jeweiligen Kontrollen ohne Salzstress.

Ergebnisse

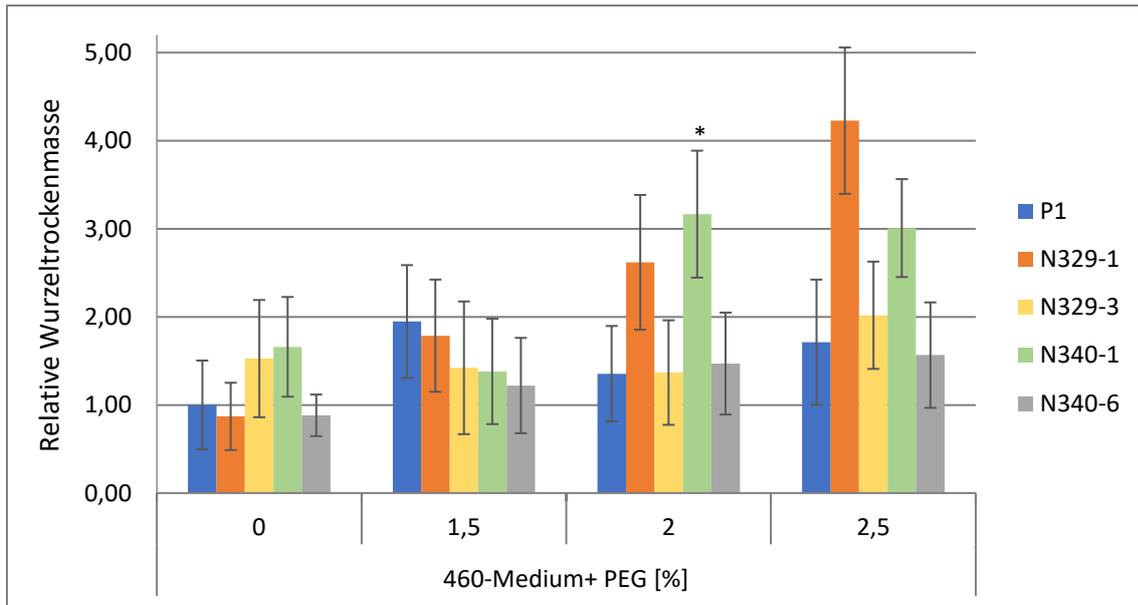


Diagramm 2: **Längenbezogene Wurzelrockenmasse nach sechs Wochen Trockenstress.**

Von jeder Pflanze wurden die Länge und das Trockengewicht des jeweils längsten Wurzeltriebes bestimmt. Aus diesen Werten wurde eine längenbezogene Wurzelmasse gebildet. Ein Mittelwert repräsentiert drei bis sechs Individuen. Eine signifikante Abweichung (*) von P1 auf 2% PEG ist nur bei N340-1 festzustellen ($p=0,04$).

3.1.3 Höhenwachstum unter Trockenstress

Trockenstress führte nach sechs Wochen zu keiner signifikanten Änderung der Höhenunterschiede. Wie in Diagramm 3 zu sehen, schien die Höhe mit zunehmendem Trockenstress abzunehmen. Hier waren die Standardabweichungen aufgrund des geringen Umfangs der untersuchten Stichprobe zu groß, um eine genaue Aussage treffen zu können.

Ergebnisse

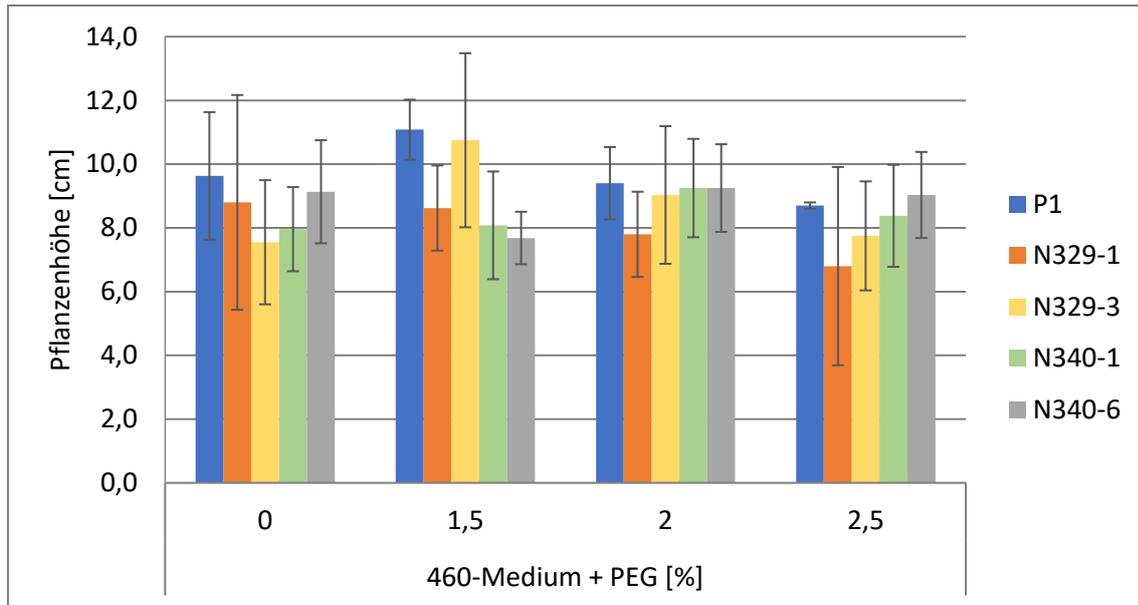


Diagramm 3: **Mittlere Pflanzenhöhen nach sechswöchiger Kultivierung unter Trockenstress.**

PEG schien mit zunehmender Konzentration die Wachstumsgeschwindigkeit der Linien P1, N329-1 und N329-3 zu senken. Bei den Linien N340-1 und N340-6 hielt sie sich im Rahmen ihrer Standardabweichungen konstant. Signifikante Unterschiede konnten nicht festgestellt werden.

3.2 Molekularbiologische Untersuchungen

In den transgenen Linien von *P. × canescens* wurde der GRAS-Transkriptionsfaktor *SCL7* überexprimiert. Die molekularbiologischen Untersuchungen dieser Arbeit beziehen sich auf zuvor festgelegte Gene, die mit einer Salz- und Trockenstresstoleranz in Verbindung stehen und durch *SCL7* reguliert werden könnten.

Untersucht wurde Wurzel- und Spross-RNA von Pflanzen welche in Kurzzeitversuchen Salz- und Trockenstress ausgesetzt waren. Für die Untersuchung von Salzstress wurden Pflanzen bis zu 24 Stunden in flüssigem 460-Medium mit 0,15 M NaCl kultiviert. Trockenstress wurde ausgelöst, indem Pflanzen in Petrischalen mit Filterpapier (Ø 70 mm) überführt wurden, welches mit 400 µL Leitungswasser befeuchtet wurde. Beleuchtet wurden die Petrischalen mit einer PFD von 1-1,5 µmol m⁻² s⁻¹.

Probennahmen waren nach sechs, zwölf und 24 Stunden vorgesehen. Bei den Trockenstressversuchen gelang dies nur nach sechs Stunden. Ergänzt wurden diese Proben mit Wurzel- und Spross-RNA, welches aus Pflanzen gewonnen wurde, die sechs Wochen auf Medien mit 0,15 M NaCl bzw. 2% PEG standen.

3.2.1 Transkriptionsfaktor *SCL7*

Die Expression des transformierten GRAS-Transkriptionsfaktors *SCL7* wurde durch einen konstitutiven Promotor verstärkt. Dieser führte im Wurzelgewebe von drei Jahre alten transgenen Pflanzen aus dem Gewächshaus zu ausgeprägten Überexpressionen von *SCL7*. Bei

Ergebnisse

in vitro-Kulturen war dies nur in Wurzel- und Sprossgewebe der Linie N340-6 der Fall (Diagramm 4). Die Expression war bei Pflanzen aus *in vitro*-Kulturen deutlich niedriger als bei Pflanzen aus dem Gewächshaus.

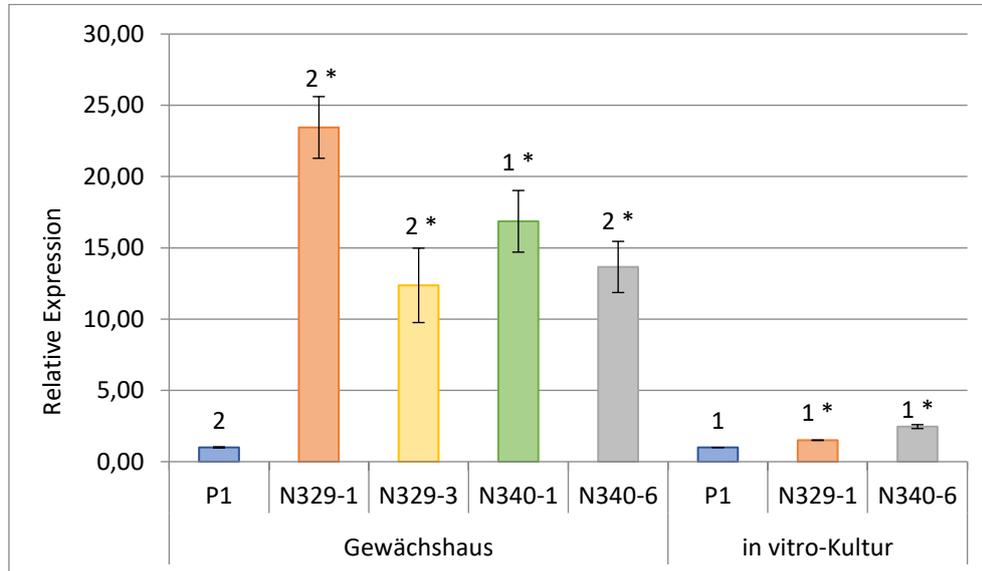


Diagramm 4: ***SCL7*-Expression in Wurzel-RNA von Pflanzen aus Gewächshaus und *in-vitro*-Kulturen.**

Die Ziffern über den Fehlerbalken beziehen sich auf die Anzahl der natürlichen Replikate in der Expressionsanalyse. Die Ergebnisse und Signifikanzen (*) sind jeweils relativ zu den Werten von P1 aus Gewächshaus bzw. *in-vitro*-Kultur. Die Expressionen der Linien N329-3 und N340-1 wurden nicht untersucht. Signifikanzen (*): $p=0,01$; $0,02$; $0,01$; $0,01$; $0,02$; $0,02$

Für einen Vergleich der *SCL7*-Expression in unterschiedlichen Geweben wurden die Analyseergebnisse von Wurzel- und Spross-RNA gegenübergestellt (Diagramm 5). Bei den Linien P1 und N329-1 ist die Expression in den Wurzeln in Relation zu der in den Sprossen erhöht. Dagegen ist sie in den beiden Gewebearten der Linie N340-6 auf einem ähnlich hohen Niveau.

Ergebnisse

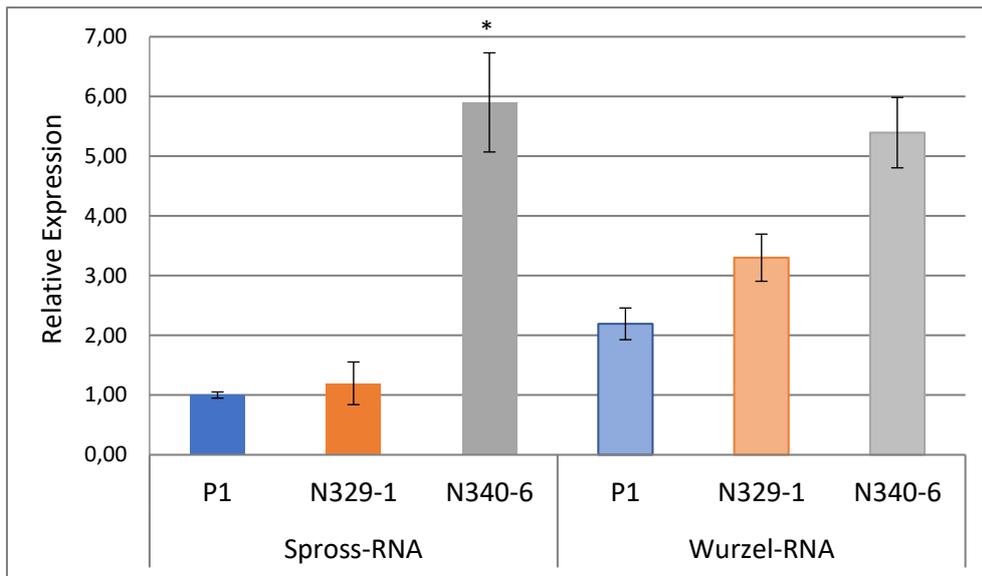


Diagramm 5: **Expression von *SCL7* in den Sprossen und Wurzeln von Pflanzen aus *in vitro*-Kulturen.**

Die Expression in den Wurzeln sind relativ zu der Spross-RNA von P1. In beiden Geweben erreicht N340-6 die höchsten Werte, diese sind aber nur in Sprossgewebe signifikant (*) höher als in P1 ($p=0,006$). Die Stärke der Expression in den Sprossen wurde durch zwei natürliche Replikate bestimmt, die in den Wurzeln durch jeweils eine Pflanze.

Expression unter Salz- und Trockenstress

Die Expression von *SCL7* bleibt in den Sprossen der Linien P1 und N329-1 unter dem Einfluss von Salz- und Trockenstress weitgehend konstant (Diagramm 6). Nach zwölf und 24 Stunden Salzstress ist eine geringe Zunahme bei P1 zu sehen (nicht signifikant).

Die Expression in der Linie N340-6 fällt mit der Zeit ab, erreicht jedoch nach sechs Wochen wieder das Niveau der Linie ohne Salzstress.

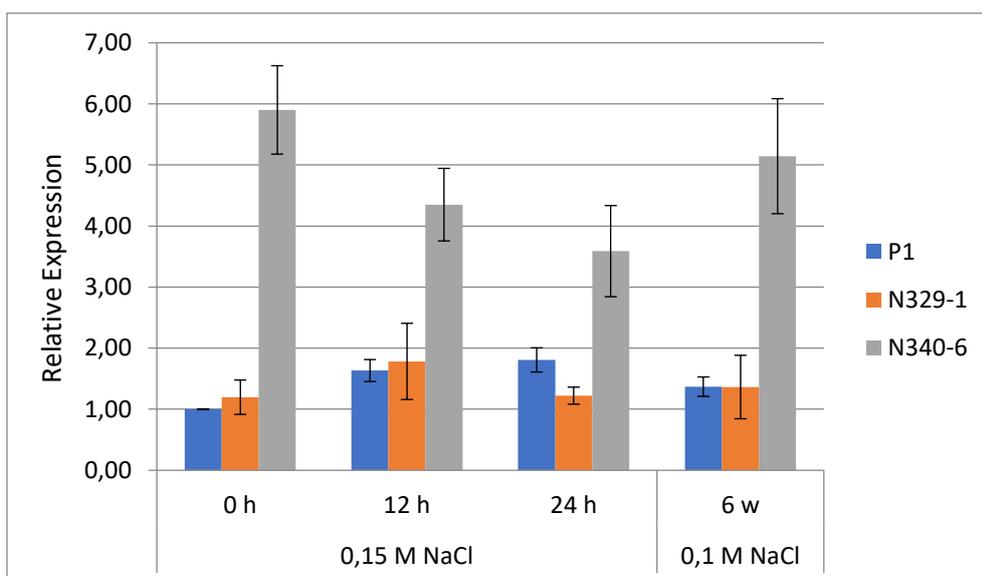


Diagramm 6: **Expression von *SCL7* in Spross-RNA unter Salzstress.**

SCL7 wird in der Linie N340-6 auch unter dem Einfluss von Salzstress überexprimiert. Die Expression von P1 ist nach zwölf und 24 Stunden leicht erhöht, die von N329-1 bleibt konstant. Die Expression ohne Salzstress wurde durch zwei natürliche Replikate bestimmt, die restlichen jeweils durch eine Pflanze.

Ergebnisse

Nach sechswöchigem Trockenstress liegt die Stärke der Expression von N340-6 unter der von P1, während sie bei den Linien P1 und N329-1 über die Zeit konstant bleibt (Diagramm 7).

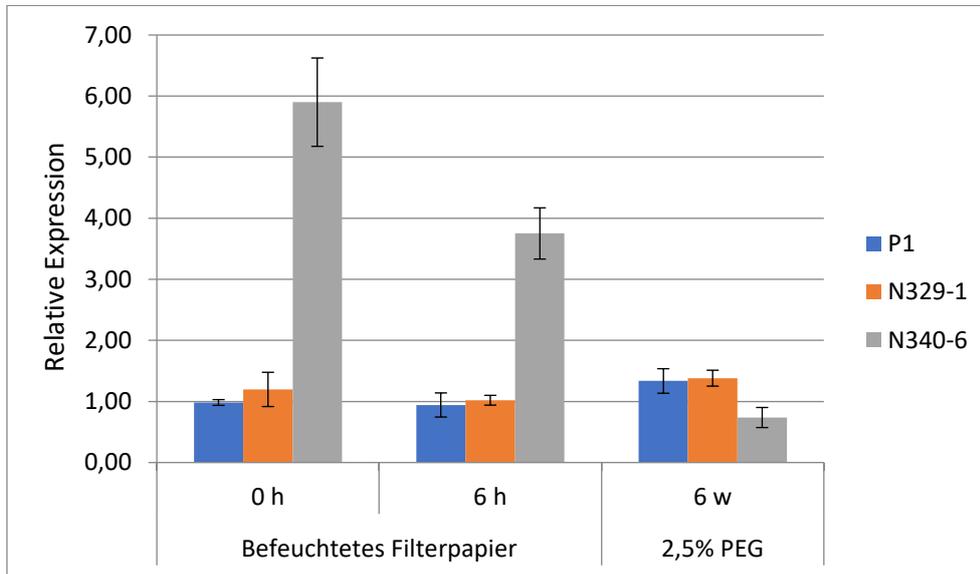


Diagramm 7: **Expression von *SCL7* in Spross-RNA unter Trockenstress.**

Unter Trockenstress wurde *SCL7* in den Linien P1 und N329-1 konstant exprimiert. Bei N340-6 sinkt das Niveau bis unter das von P1. Die Expression ohne Trockenstress wurde durch zwei natürliche Replikate bestimmt, die restlichen jeweils durch eine Pflanze.

Auch in Wurzelgewebe sinkt die Stärke der Expression von *SCL7* nach dem Einsetzen von Salzstress schnell ab, beginnt jedoch nach zwölf Stunden wieder anzusteigen. Dieser Effekt ist bei allen untersuchten Linien, am stärksten jedoch bei N340-6, zu beobachten (Diagramm 8).

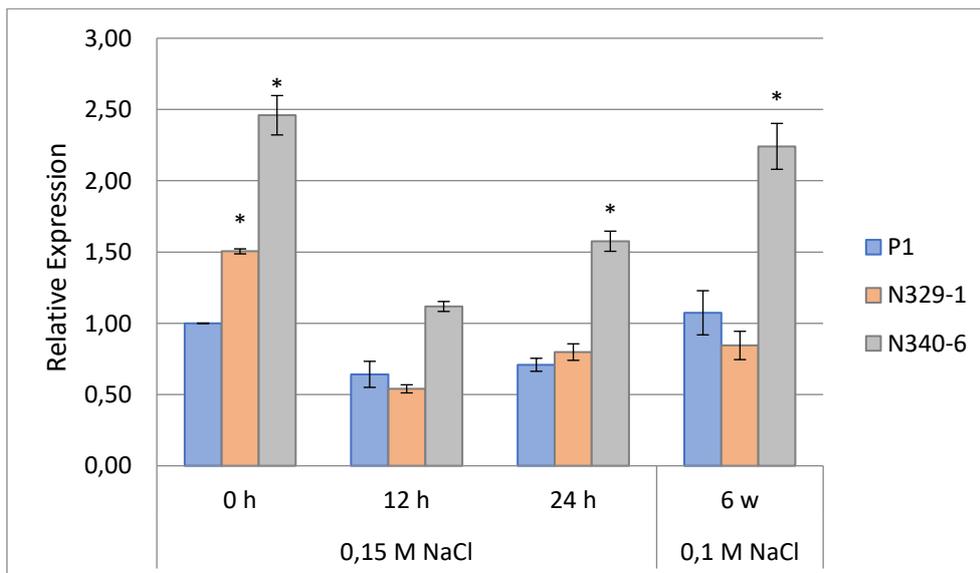


Diagramm 8: **Expression von *SCL7* in Wurzel-RNA unter Salzstress.**

Durch das Einsetzen von Salzstress sinkt die Expression rasch ab und beginnt nach zwölf Stunden wieder anzusteigen. Expression ohne Salzstress in N329-1 und N340-6 signifikant höher als in P1. Unter Salzstress ist N340-6 nach 24 Stunden und sechs Wochen signifikant (*) höher als P1. Die Expressionsstärken wurden durch die Analyse von jeweils einer Pflanze bestimmt. Signifikanzen: p=0,02; 0,02; 0,01; 0,02

3.2.2 Transkriptionsfaktor *SCL4*

Vor dem Einsetzen von Salz- oder Trockenstress wurde der GRAS-Transkriptionsfaktors *SCL4* in den transgenen Linien schwächer exprimiert als in P1. Die Expression wurde in den Sprossen durch das Einwirken von Salzstress verstärkt (Diagramm 9). In P1 hielt die erhöhte Expression auch nach sechs Wochen an. Die transgenen Linien zeigten einen schnellen Anstieg der Expression. Diese sank nach sechs Wochen anhaltendem Salz- oder Trockenstress wieder auf das Niveau ihrer Anfangszustände.

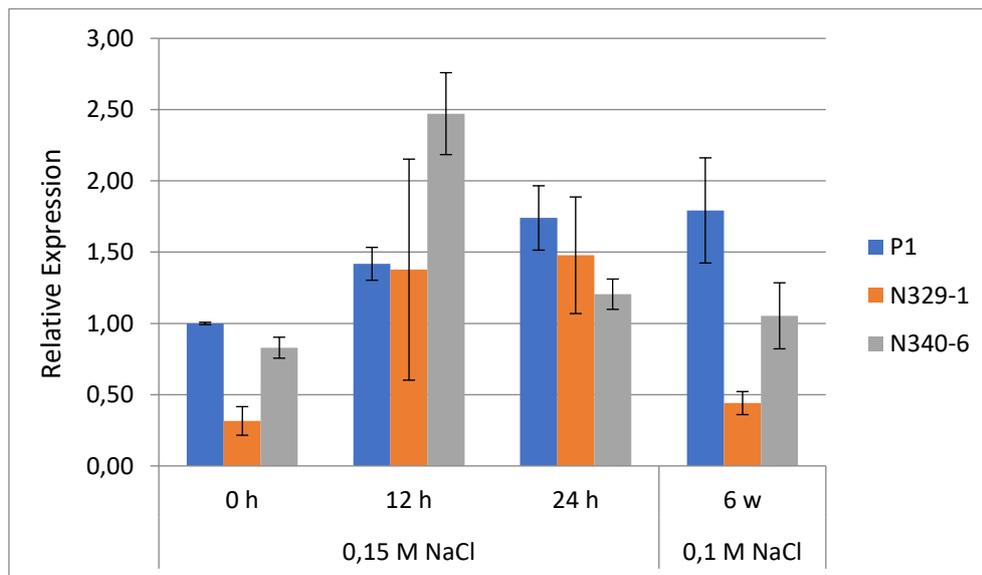


Diagramm 9: **Expression von *SCL4* in Spross-RNA unter Salzstress.**

Die *SCL4*-Expression stieg in den transgenen Linien unter Salzstress schnell an, sank dann aber wieder ab. In P1 stieg sie langsamer und behielt die nach 24 Stunden erreichte Expressionsstärke sechs Wochen bei. Die Expressionsstärken wurden durch die Analyse von jeweils einer Pflanze bestimmt.

Auch Trockenstress führte in den untersuchten Pflanzen zu einer Verstärkung der *SCL4*-Expression nach sechs Stunden und nach sechs Wochen zu einem Angleich an eine Stärke, die der Hälfte von P1 ohne Salzstress entsprach (Diagramm 10). Nach sechs Stunden war die Expression in N340-6 signifikant höher ($p=0,02$) und in N329-1 nur halb so stark wie in P1.

Ergebnisse

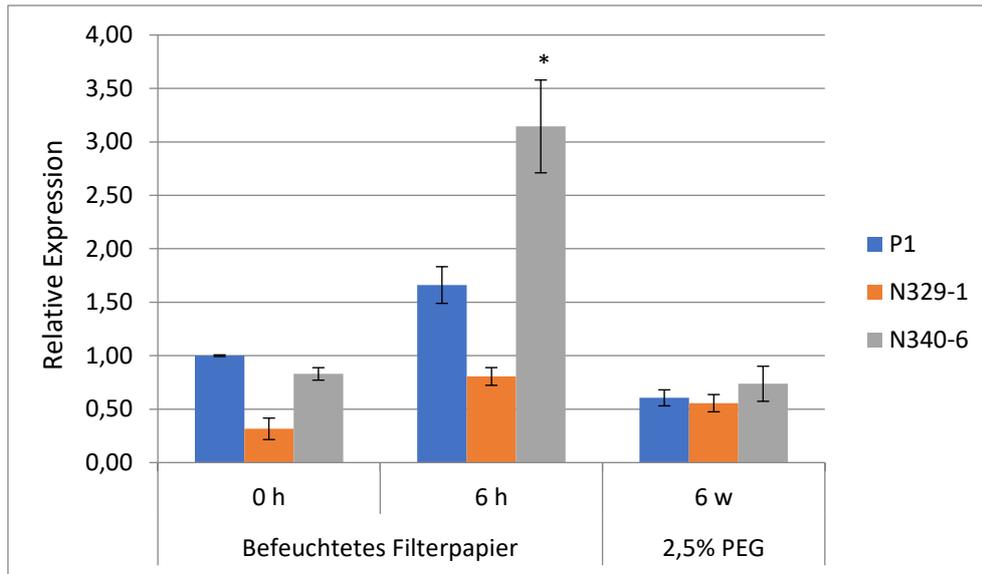


Diagramm 10: **Expression von SCL4 in Spross-RNA unter Trockenstress.**

Nach sechs Stunden auf befeuchtetem Filterpapier stieg die Expression in allen Linien an, in N340-6 signifikant (*) mehr als in P1 ($p=0,02$). Nach sechs Wochen liegen alle Linien auf einem ähnlichen, erniedrigten Niveau. Die Expressionsstärken wurden durch die Analyse von jeweils einer Pflanze bestimmt.

3.2.3 α -Amylase *AMY1*

Die α -Amylase *AMY1* wurde in allen untersuchten Linien durch das Einsetzen von Salz- und Trockenstress überexprimiert. Nach sechswöchigem Salz- bzw. Trockenstress war dies nur noch bei den transgenen Linien zu beobachten. Dabei fiel auf, dass N329-1 verstärkt auf Salzstress (Diagramm 11) und N340-6 verstärkt auf Trockenstress (Diagramm 12) reagiert.

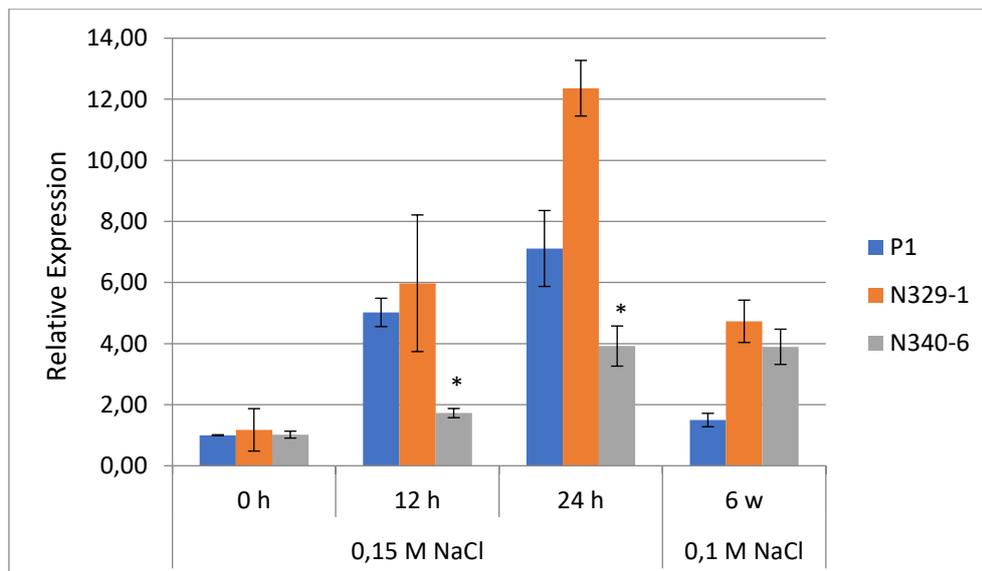


Diagramm 11: **Expression von AMY1 in Spross-RNA unter Salzstress.**

P1 und N329-1 reagieren auf Salzstress bereits nach zwölf Stunden mit einer gesteigerten Expression von *AMY1*. In N340-6 ist die Expression nach zwölf ($p=0,001$) und 24 Stunden ($p=0,02$) signifikant (*) geringer als in P1. Die Expressionsstärken wurden durch die Analyse von jeweils einer Pflanze bestimmt.

Ergebnisse

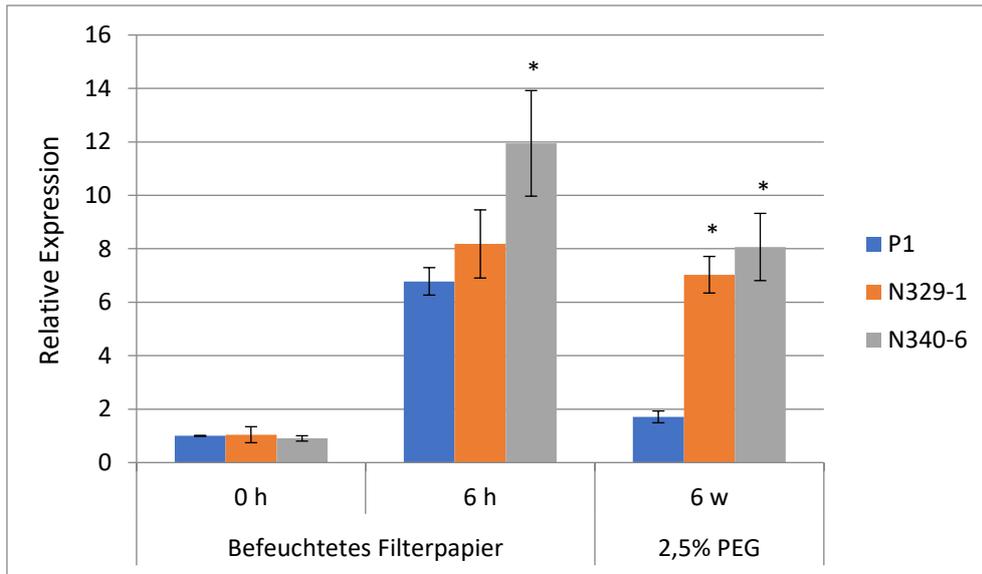


Diagramm 12: **Expression von *AMY1* in Spross-RNA unter Trockenstress.**

Trockenstress führt nach sechs Stunden bei allen Linien zu einer Überexpression von *AMY1* und ist in N340-6 signifikant (*) größer ($p=0,02$) als in P1. Nach sechs Wochen ist die Signifikanz bei N329-1 ($p=0,02$) und N340-6 ($p=0,01$) gegeben. Die Expressionsstärken wurden durch die Analyse von jeweils einer Pflanze bestimmt.

Für Expressionsanalysen mit Wurzelgewebe stand Pflanzenmaterial aus einem vorangegangenen Praktikum zur Verfügung. Mit diesem konnten die Folgen von viermonatigem Salzstress auf die Expression von *AMY1* untersucht werden.

Es zeigte sich, dass Wurzelgewebe deutlich langsamer auf den einwirkenden Salzstress reagierte als Sprossgewebe. Nach sechs Wochen ist die Expression von *AMY1* in N340-6 und P1 überexprimiert, in N340-6 signifikant ($p=0,02$) mehr als in P1 (Diagramm 13).

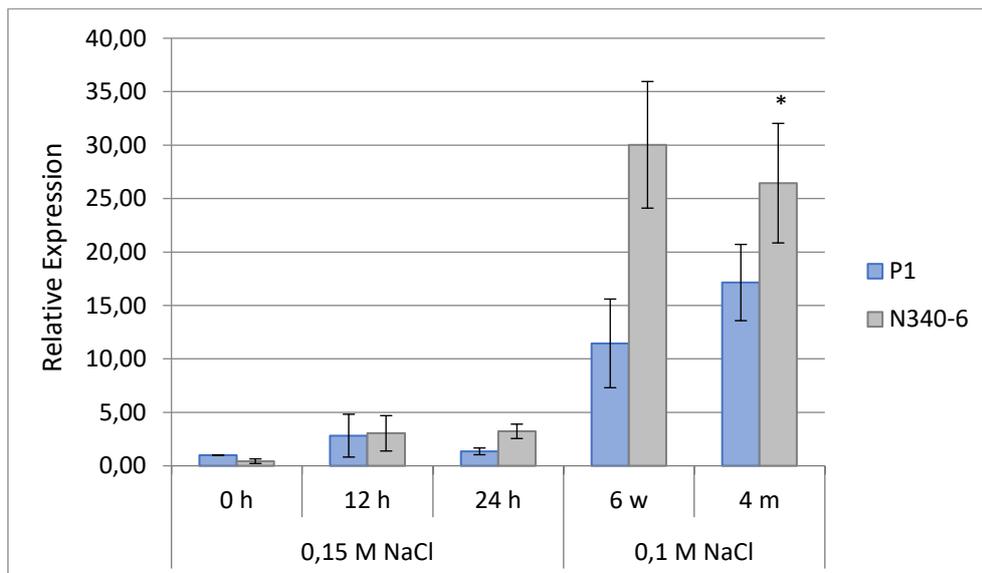


Diagramm 13: **Expression von *AMY1* in Wurzel-RNA unter Salzstress.**

Im Rahmen der Kurzzeitversuche (24 Stunden; 0,15 M NaCl) war die Intensität der *AMY1*-Expression leicht erhöht. Nach sechs Wochen und vier Monaten ist *AMY1* in beiden Linien überexprimiert, wobei sie in N340-6 signifikant (*) von P1 abweicht ($p=0,02$). Proben von N329-1 wurde bei dieser Analyse nicht berücksichtigt. Die Expressionsstärken wurden durch die Analyse von jeweils einer Pflanze bestimmt.

3.2.4 Cellulosesynthase *CesA7*

Unter Salzstress kam es zu einem raschen Absinken der Expression von P1 (Diagramm 14). Die transgenen Linien reagierten auf die Anwesenheit von Salz zunächst mit einer Erhöhung ihres Expressionslevels, dieses fiel im weiteren Verlauf ab und war nach sechs Wochen unter dem von P1. Signifikant höhere Expressionen als P1 wies N340-6 nach sechs und 24 Stunden auf ($p=0,003$ und $p=0,002$).

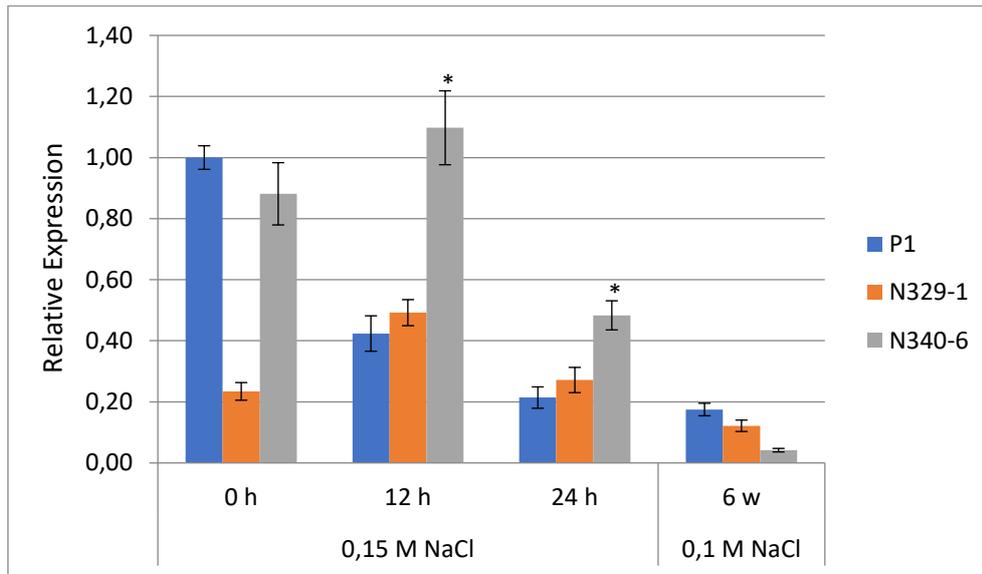


Diagramm 14: **Expression von *CesA7* in Spross-RNA unter Salzstress.**

Die Expression sinkt durch Salzstress in P1 sofort ab und ist nach 24 Stunden und sechs Wochen fünffach reduziert. In den transgenen Linien ist sie nach zwölf Stunden gestiegen und sinkt im weiteren Verlauf. Die Expression in N340-6 ist nach zwölf Stunden ($p=0,003$) und 24 Stunden ($p=0,002$) signifikant (*) größer als in P1. Die Expressionsstärken wurden durch die Analyse von jeweils einer Pflanze bestimmt.

Kurzzeitiger Trockenstress führte zu einem vollständigen Einbruch der *CesA7*-Expression (Diagramm 15). Dagegen wiesen P1 und N329-1 nach sechs Wochen annähernd gleiche Expressionslevel auf wie zu Beginn des Versuchs, während das von N340-6 deutlich erniedrigt war. Hier wurde allerdings ein anderer Typ Stress initiiert: Trockenstress durch PEG, nicht auf Filterpapier.

Ergebnisse

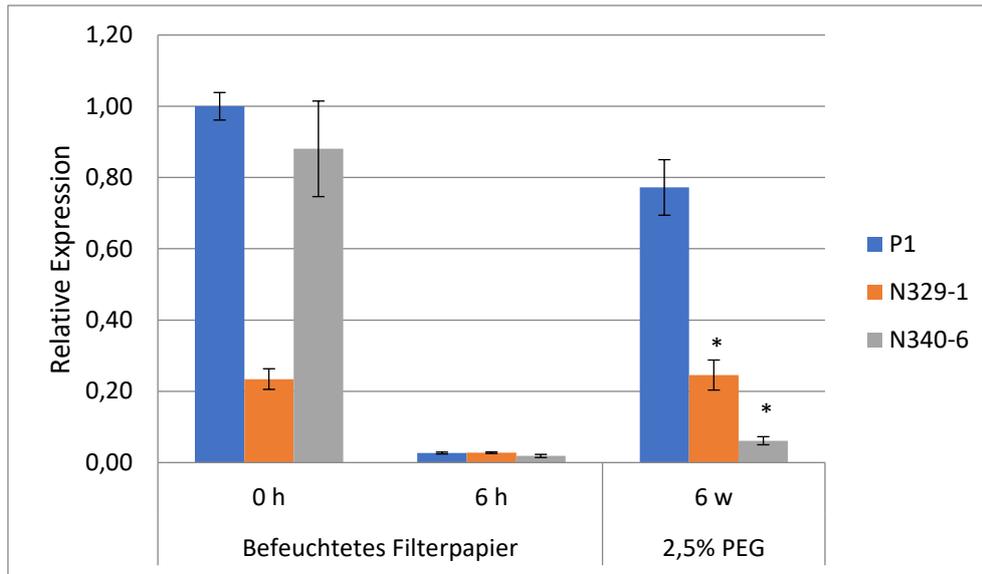


Diagramm 15: **Expression von *CesA7* in Spross-RNA unter Trockenstress.**

Nahezu vollständige Unterdrückung der Expression nach sechsständigem Trockenstress. Rückgang der Expression nach sechs Wochen nur bei N340-6. Die Expressionsstärken wurden durch die Analyse von jeweils einer Pflanze bestimmt.

3.2.5 Callosesynthese *CaIS1* und Na^+/H^+ -Antiporter *SOS1*

Die Expression der Callosesynthese *CaIS1* stieg unter dem Einfluss von Salzstress um das doppelte an (Diagramm 16). Unterschiede zwischen den Linien P1 und N340-6 wurden nicht beobachtet. Weitere Analysen wurden nicht durchgeführt.

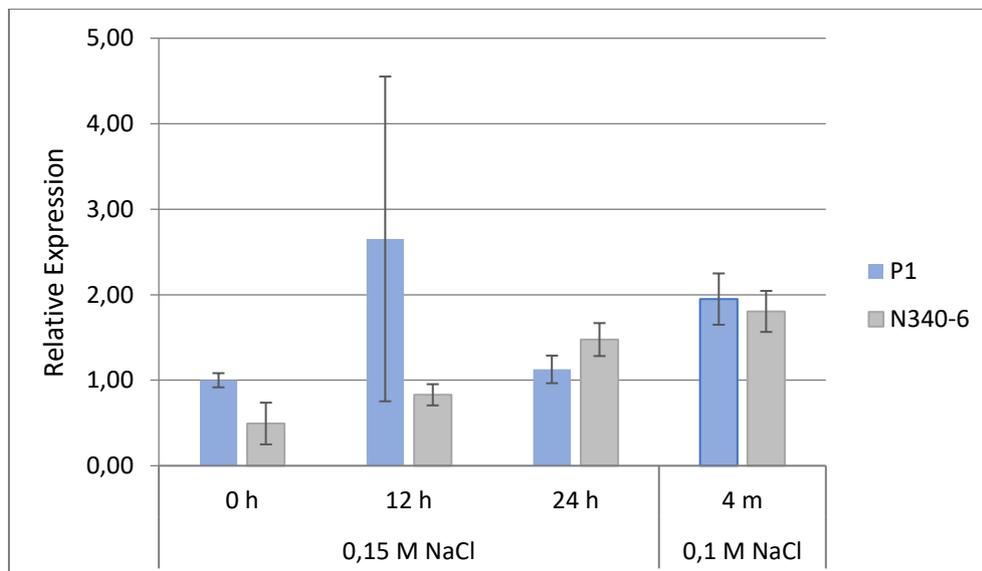


Diagramm 16: **Expression von *CaIS1* in Wurzel-RNA unter Salzstress.**

Die Expression war in N340-6 zu Beginn niedriger als in P1. Unter Salzstress glichen sich die Niveaus der Linien an und stiegen gemeinsam. Der Wert von P1 nach zwölf Stunden wurde aufgrund des hohen Fehlers nicht berücksichtigt. Kein Unterschied zwischen den beiden Linien unter Berücksichtigung der Messunsicherheit. Die Expressionsstärken wurden durch die Analyse von jeweils einer Pflanze bestimmt.

Ergebnisse

Das Expressionsniveau des Na⁺/H⁺-Antiporters *SOS1* war ohne den Einfluss von Stress in N340-6 niedriger als in P1 (Diagramm 17). Da jedoch unter Salzstress kein Unterschied zu erkennen war, wurde dieses Gen nicht weiter untersucht.

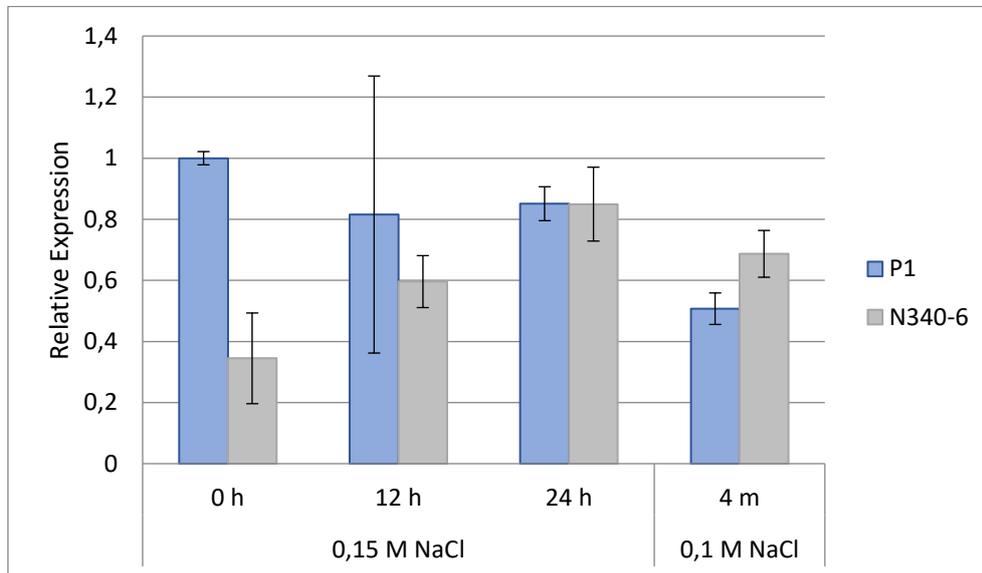


Diagramm 17: **Expression von *SOS1* in Wurzel-RNA unter Salzstress.**

Ohne Salzstress war die Expression in N340-6 geringer als in P1, unter Salzstress stieg sie an und erreichte nach 24 Stunden das Niveau von P1. Die Expressionsstärken wurden durch die Analyse von jeweils einer Pflanze bestimmt.

4. Diskussion

4.1 Phänotypische Untersuchungen

4.1.1 Gesteigerte Produktion von Wurzelmasse unter Salzstress

Die transgenen Linien und der Wildtyp (P1) von *P. × canescens* reagierten auf Salzstress (0,05 M und 0,1 M NaCl) mit einer gesteigerten Produktion von Wurzelmasse. Diese nahm mit steigender Salzkonzentrationen zu. Die transgenen Linien produzierten auch ohne Salzstress mehr Wurzelmasse als P1.

Da die Länge der Wurzeln nicht gemessen wurde, kann keine Aussage darüber getroffen werden, ob dieser Massezuwachs durch eine erhöhte Dichte oder ein erhöhtes Längenwachstum verursacht wurde. Eine Studie von West *et al.* (2004) zeigt, dass die Wachstumsgeschwindigkeit der Wurzeln von *A. thaliana* unter Salzstress (0,09 M NaCl) über einen Untersuchungszeitraum von sieben Tagen konstant blieb, während sie ohne Salz kontinuierlich stieg. Die Zunahme der Wurzelmasse könnte so durch eine Erhöhung der Dichte, in Form einer gesteigerten Cellulosesynthese, verursacht worden sein. Endler *et al.* (2015) sehen hier einen pflanzlichen Kompensationsmechanismus gegen die Auswirkungen von Salzstress.

Da die transgenen Linien bereits vor dem Einsetzen von Salzstress eine erhöhte Wurzelmasse aufwiesen und von Brüggmann (2017) ein erhöhter Cellulosegehalt im Kambium von Pflanzen festgestellt wurde, in denen *SCL7* überexprimiert wurde, könnte die Zunahme der Dichte auf eine gesteigerte Cellulosesynthese als Folge einer *SCL7*-Überexpression zurückgeführt werden. Die transgenen Pflanzen könnten so schon vor dem Einsetzen von Salzstress besser vor diesem geschützt gewesen sein.

4.1.2 Höhenwachstum unter Salz- und Trockenstress

Unter Salz- und Trockenstress müssen Pflanzen Teile ihrer zur Verfügung stehenden Energie für Kompensationsmechanismen aufbringen. Es wurde erwartet, dass in der Folge weniger Energie für das Höhenwachstum aufgewendet wird. Unter Salzstress wurde dies auch bestätigt. Dabei zeigten jedoch die Linien N329-3 und N329-6 eine höhere Wachstumsgeschwindigkeit als P1. Hier könnte eine erhöhte Biomasseproduktion, in Folge der Überexpression von *SCL7*, vorliegen. Genaue Aussagen können an dieser Stelle nicht getroffen werden, da die Pflanzen weder zu Beginn noch am Ende des Versuchs vermessen wurden.

Eine Höhenbestimmung nach sechswöchigem Trockenstress ließ auf konstante Wachstumsgeschwindigkeiten schließen. Dabei muss berücksichtigt werden, dass die Höhe der Pflanzen zu Beginn der Salz- und Trockenstressversuche um bis zu einem Zentimeter variierte. Auch hier wurden die Pflanzenhöhe zu Beginn des Versuchs nicht gemessen. Diese

Abweichungen ergaben sich aus dem Umstand, dass die Pflanzen mit Wurzeln umgesetzt wurden und eine Anpassung der Höhe so nicht möglich war.

Die konstanten Wachstumsgeschwindigkeiten der Pflanzen, mit und ohne Trockenstress, könnten auf geringere Durchmesser der Pflanzensprosse zurückgeführt werden, die den Auswirkungen von Trockenstress ausgesetzt waren. Daraus ergibt sich die Annahme, dass es unter Trockenstress zu einer Abnahme der Biomasseproduktion kommt.

4.1.3 Längere Wurzeln unter Trockenstress

Das Wurzelwachstum unter Trockenstress zeigte bei zwei transgenen Linien Auffälligkeiten. Diese zeigte sich in Form eines schnellen Anstiegs der längenbezogenen Wurzelmasse unter steigendem Trockenstress. Bei den restlichen Linien war dieser Anstieg langsamer.

Es kann vermutet werden, dass auch hier die Cellulosesynthese eine wichtige Rolle spielte, da zwei transgene Linien auch ohne Trockenstress höhere Massen aufwiesen. Chen *et al.* (2005) haben gezeigt, dass die Überexpression der Cellulosesynthase (*AtCesA8*) in *A. thaliana* den Wasserverlust unter Trockenstress verringerte. Bei den Linien mit der erhöhten Wurzelmasseproduktion könnte dieser Mechanismus Stoffwechselaktivitäten, wie die der Synthese von Cellulose, geschützt und so zu den höheren Wurzelmassen beigetragen haben.

4.1.4 Beleuchtungsstärke als wichtiger Faktor bei Salz- und Trockenstress

Die Höhe der Photonenflussdichte (PFD) hatte in der Untersuchung Einfluss auf die Auswirkungen von Salz- und Trockenstress. Pflanzen, die auf Medien mit 0,15 M NaCl kultiviert wurden, waren bei einer höheren PFD ($25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) stärker von Stress betroffen als bei einer niedrigeren ($10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Anzeichen dafür waren eine erhöhte Anzahl verfärbter und zum Teil bereits abgeworfener Blätter. Trockenstress, ausgelöst durch 2,5% PEG, hatte einen gegenteiligen Effekt. Hier schien eine höhere PFD die Auswirkungen von Trockenstress zu minimieren.

Sowohl bei Salz- als auch bei Trockenstress könnte eine vermehrte Bildung von radikalen Sauerstoffspezien (ROS) zu den beobachteten Effekten geführt haben. Murata *et al.* (2007) postulierten, dass hohe Salzkonzentrationen zu einer Inaktivierung des CO_2 -fixierenden Enzyms Rubisco führt. Der so entstehende CO_2 -Mangel führte zum Erliegen des Calvin-Zyklus und so zu einem Mangel an ADP und NADP^+ . Wenn diese Elektronenakzeptoren bei der Photosynthese fehlen, können die dort frei werdenden Elektronen auf Sauerstoffmoleküle übertragen werden. Die so entstandenen ROS reichern sich an und wirken sich negativ auf den Stoffwechsel der Zelle aus. Durch dieses Zusammenwirken kann die verstärkte Schädigung der Pflanzen erklärt werden, die neben Salzstress auch einer höheren PFD ausgesetzt waren. Trockenstress kann es ebenfalls zu einer stärkeren Bildung von ROS führen. Pflanzen verschließen bei Wassermangel ihre Stomata (Laskowska-Kosegarten, 2001). Die Folge ist ein

CO₂-Mangel, der wiederum zu einer gesteigerten Photorespiration führt. Zu deren Produkten zählen unter anderem ROS, die durch die Übertragung von Elektronen durch das Enzym Rubisco auf Sauerstoffmoleküle entstehen (Miller *et al.*, 2010).

Der beobachtete Effekt geringerer Anzeichen von Trockenstress bei einer höheren PFD könnte durch Temperaturunterschiede in den Kulturgefäßen erklärt werden. Es kann vermutet werden, dass die Temperatur in den Gefäßen mit steigender PFD zunahm. Diese führte zu einer erhöhten Luftfeuchtigkeit durch verdunstendes Medium. Die Blätter der Pflanzen könnten so über die Luft mit Wasser versorgt worden sein, welches den Wurzeln durch das PEG im Medium nur eingeschränkt zur Verfügung stand. Ein Verschließen der Stomata und ein dadurch entstandener CO₂-Mangel könnte dadurch verzögert worden sein.

Auffällig war zudem, dass sich die beschriebenen Effekte erst nach fünf bis sechs Wochen bei Pflanzen zeigten, die in den ersten drei Wochen einer geringeren PFD ausgesetzt waren. In diesen ersten Wochen könnten die durch die ROS verursachten Gewebeschäden Ausmaße erreicht haben, die von den Reparaturmechanismen der Zellen nicht mehr kompensiert werden konnten.

4.2 Expressionsanalysen

Bei der Interpretation der Ergebnisse muss berücksichtigt werden, dass die durchgeführten Expressionsanalysen überwiegend von jeweils einem Individuum erhoben wurden. Zur Erhöhung der Genauigkeit wurde mit zwei technischen Replikaten gearbeitet. Für eine abschließende Überprüfung der gewonnenen Erkenntnisse in Form weiterer Expressionsanalysen fehlte am Ende dieser Bachelorarbeit die Zeit.

4.2.1 *SCL7*-Expression in Pflanzen aus *in vitro*-Kultur und Gewächshaus

SCL7 wurde in transgenen Pflanzen aus dem Gewächshaus zehn bis 20-mal so stark exprimiert wie in Pflanzen aus *in vitro*-Kulturen.

Ein direkter Vergleich ist an dieser Stelle jedoch nicht möglich. Die Wurzelproben aus dem Gewächshaus stammten von drei Jahre alten Pflanzen, während die *in vitro*-Kulturen nur wenige Monate alt waren. Die untersuchten Gewebe wiesen folglich einen unterschiedlichen Stand ihrer Entwicklung auf. Hinzu kamen unterschiedliche Kultivierungsbedingungen.

Die Gewächshauspflanzen waren jahreszeitlichen Temperaturschwankungen unterworfen. Sie standen mit ihren Wurzeln in Erde und waren dort, wie auch ihre Stämme und Blätter, biotischen und abiotischen Einflüssen ihrer Umgebung ausgesetzt. Bei *in vitro*-Kultivierungen waren dagegen Temperatur und Luftfeuchtigkeit konstant. Sie wurden mit immer gleicher Intensität und ohne nächtliche Pausen beleuchtet. Durch das verwendete Medium waren auch

die Wurzeln nicht vor Licht geschützt. Wie sich diese Faktoren auf den verwendeten *35S*-Promotor auswirkten, ist nicht bekannt.

Konsequenz solcher Beobachtungen ist, dass Erkenntnisse, die aus Arbeiten mit *in vitro*-Kulturen gewonnen wurden, nicht ohne weiteres auf die Entwicklung von Pflanzen im Gewächshaus übertragen werden können. Gleiches gilt für den Transfer von Pflanzen aus dem Gewächshaus ins Freiland.

Eine negative Beeinflussung der Experimente dieser Arbeit wird durch die schwächere Expression von *SCL7* in den *in vitro*-Kulturen nicht erwartet. In seiner Funktion als Transkriptionsfaktor hat *SCL7* auch durch geringe Steigerungen der Expressionsrate die Stoffwechselwege der Zelle effektiv verändert.

4.2.2 Gegensätzliche Expression von *SCL7* und *SCL4*

Die homologen Gene *SCL7* und *SCL4* reagierten gegensätzlich auf einsetzenden Salz- und Trockenstress. Wie von Ma *et al.* (2010) beschrieben, sank in den transgenen Linien die Expression von *SCL7* nach dem Einwirken von Stressfaktoren ab, während die von *SCL4* stieg. Es fiel auf, dass P1 unter Salzstress von dieser Beobachtung abwich. In Spross-RNA kam es unter Salzstress bei beiden Genen zu einer verstärkten Expression, die auch nach sechs Wochen über dem Niveau der Expression ohne Stress lag.

Dies könnte durch eine Induktion von *SCL4* durch das endogen exprimierte *SCL7* erklärt werden. Die verstärkte Expression von *SCL7* könnte bei den transgenen Linien die endogene herunter reguliert haben.

Transformiert wurden P1 mit einer *SCL7*-Sequenz aus *P. trichocarpa*. Diese wich um 1,9% von der aus *P. × canescens* ab. Für den diskutierten Erklärungsansatz müsste diese Abweichung zum einen klein genug sein, um die endogene Expression herunter zu regulieren und zum anderen groß genug, um die von *SCL4* nicht direkt anregen zu können.

Interessant wären an dieser Stelle weiterführende Versuche mit Pflanzen, in denen *SCL4* bzw. *SCL4* und *SCL7* überexprimiert wird.

4.2.3 Erhöhte Expression der α -Amylase *AMY1*

Die Stärke der *AMY1*-Expression wurde in allen untersuchten Linien durch Salz- und Trockenstress gesteigert. Dabei unterschieden sich die transgenen Linien deutlich von P1. So führte die schwach erhöhte *SCL7*-Expression in N329-1 zu einem Anstieg der *AMY1*-Expression, die sich zunächst nur gering von der in P1 unterschied. In N340-6 führte Salzstress im Sprossgewebe zu einem deutlich langsameren Anstieg der *AMY1*-Expression. Beide transgenen Linien wiesen nach sechs Wochen eine höhere *AMY1*-Expression auf als P1.

Die verlangsamte Steigerung der *AMY1*-Expression in N340-6 ließe sich dadurch erklären, dass Pflanzen durch eine Überexpression von *SCL7* zunächst besser gegen störende Einflüsse durch

Salzstress geschützt waren. Dieser Theorie folgend, wurde die *AMY1*-Expression erst hochreguliert, als sich der Salzstress auf den Stoffwechsel der Zelle auswirkte. Dafür spricht, dass die Expression in Wurzelgewebe von N340-6 auch nach vier Monaten noch deutlich über der von P1 liegt.

Kempa *et al.* (2008) wiesen einen Anstieg der Maltose-Konzentration in *A. thaliana* als Reaktion auf Salzstress nach, einem Produkt der α -Amylase. Ob eine verstärkte *AMY1*-Expression zu einer weiteren Erhöhung der Konzentration führt, und ob Maltose nur als kompatibles Solut fungiert oder als Substrat für weiterführende Stoffwechselwege dient, bleibt ungewiss. Hier wäre eine Kopplung von Metaboliten- und Expressionsanalyse interessant.

4.2.4 Cellulosesynthase *CesA7*

Die Expression von *CesA7* wurde unter Salzstress im Spross herunterreguliert. Diesem Trend folgte N340-6 erst nach zwölf Stunden. Auch hier könnte die starke Expression von *SCL7* zu einer anfänglichen Resistenz gegenüber Salzstress geführt haben. Denkbar wäre ein erhöhter Cellulosegehalt der Wurzeln, der das Eindringen von Na^+ -Ionen verlangsamt. Unter Trockenstress sank die Expression in den transgenen Linien mit der Zeit ab, während sie in P1 nach sechs Wochen nur gering reduziert war.

In beiden Fällen könnten die transgenen Linien durch ihre erhöhte Expression von *SCL7* von einer hochregulierten Cellulosesynthase profitieren, die im Rahmen dieser Untersuchungen nicht berücksichtigt wurde.

4.2.5 Callosesynthase *CalS1* und Na^+/H^+ -Antiporter *SOS1*

Die Expression der Callosesynthase *CalS1* wurde nur im Wildtyp und einer transgenen Linie untersucht. In beiden Linien kam es unter Salzstress zu einer Verdopplung der Expression. Da die Synthese von Callose zu den ersten pflanzlichen Reaktionen auf Salzstress gehört (Cui und Lee, 2016), wurde im Vorfeld von keiner gesteigerten Expression, ausgelöst durch eine Überexpression von *SCL7*, ausgegangen. Motivation für eine Expressionsanalyse war, dass *CalS1* ein Marker für beginnenden Stress in einer Zelle sein könnte. Sollten andere Mechanismen, wie eine gesteigerte Cellulose- oder Antiporteraktivität, die Auswirkungen von Stress zunächst kompensieren, könnte dies durch einen verzögerten Anstieg der *CalS1*-Expression ersichtlich sein. Die durchgeführte Analyse konnte diese Theorie jedoch nicht bestätigen und sie wurde nicht weiter verfolgt.

Die Expression von *SOS1* wurde im Wildtyp und einer transgenen Linie überprüft. Ohne den Einfluss von Salzstress zeigte sich in der transgenen Linie eine niedrigere Expression als in P1. Diese Abweichung verschwand nach 24 Stunden Salzstress. Nach dieser Zeit lagen beide

Expressionsniveaus auf der Höhe von P1 ohne Salzstress. Diese Abweichung konnte im Rahmen der laufenden Versuche nicht gedeutet werden und wurde nicht weiterverfolgt.

5. Ausblick

Die Untersuchungen dieser Arbeit zeigen, dass die Überexpression des GRAS-Transkriptionsfaktors *SCL7* in *P. × canescens* zu einer Erhöhung der Salz- und Trockenstresstoleranz führte. Hinweise dafür lieferten phänotypische Untersuchungen. Diese deuten darauf hin, dass das Wachstum unter Salzstress in den transgenen Linien weniger beeinträchtigt wurde als im Wildtyp. Zudem konnte eine vermehrte Bildung von Wurzelmasse unter Salz- und Trockenstress festgestellt werden.

Auf molekularer Ebene konnte eine erhöhte Expression der α -Amylase *AMY1* nachgewiesen werden. Diese wird in mehreren Studien in Verbindung mit Salz- und Trockenstresstoleranzen gebracht. Hier wäre es interessant, durch eine Kopplung von Metaboliten- und Expressionsanalysen, weitere Erkenntnisse über den genauen Beitrag der α -Amylase zu Salz- und Trockenstresstoleranzen zu erlangen.

Ergebnisse dieser Arbeit deuten auf eine gesteigerte Cellulosesynthese hin. Suzuki *et al.* (2006) identifizierten in dem Genom von *P. trichocarpa* 18 Xylem-spezifische Cellulosesynthasen, aus denen drei in diese Arbeit übernommen wurden. Unter diesen wurde keine gesteigerte Expression festgestellt. Eine weitere Suche erscheint hier erfolgsversprechend.

Des Weiteren konnte eine Verbindung zwischen *SCL7* und dem dazu homologen *SCL4* festgestellt werden. Diese Gene schienen sich unter Stress gegenseitig zu beeinflussen, wobei die Funktion von *SCL4* ungewiss blieb. Es scheint jedoch als mögliches Kandidatengen für eine weitere Steigerung der Salz- und Trockenstresstoleranz in Frage zu kommen. Interessant wären weiterführende Untersuchungen in Form einer Überexpression von *SCL4* bzw. einer kombinierten Überexpression von *SCL4* und *SCL7*.

6. Literatur

Aas G (2006) Die Schwarzpappel (*Populus nigra*) – Zur Biologie einer bedrohten Baumart. In: Beiträge zur Schwarzpappel, Berichte der Bayerischen Landesanstalt für Wald und Forstwirtschaft (LWF) (Hrsg.), Freising, ISSN 0945-8131.

Anonymous (2002) Agilent 2100 bioanalyzer. Application compendium. Agilent Technologies, 39-49

Becker C, Riedmaier I, Pfaffl MW (2009) MIQE-Guidelines. RNA-Qualitätskontrolle in der Genexpressionsanalytik. *BIOspektrum*, 5, 512-515

Bielefeldt J, Bolte A, Busch G, Dohrenbusch A, Kroiher F, Lamersdorf N, Schulz U, Stoll B (2008) Energieholzproduktion in der Landwirtschaft. Chancen und Risiken aus Sicht des Natur- und Umweltschutzes. Göttinger Bodeninitiative GBI e.V., 4-9

Bolle C (2004) The Role of GRAS proteins in plant signal transduction and development. *Planta*, 218, 683-692

Brügmann T (2017) Genetische Modifikation von *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CANSTANS1 (SOC1)*, *FRUITFULL (FUL)* und weiterer Kandidatengene in Pappelhybriden (*Populus spec.*). Dissertation, Hamburg, URN: <http://ediss.sub.uni-hamburg.de/volltexte/2017/8429/pdf/Dissertation.pdf>

Chen Z, Hong X, Zhang H, Wang Y, Li X, Zhu JK, Gong Z (2005) Disruption of the cellulose synthase gene, *AtCesA8/IRX1*, enhances drought and osmotic stress tolerance in Arabidopsis. *The Plant Journal*, 43, 273-283

Cui W, Lee JY (2016) Arabidopsis Callose synthases CalS1/8 regulate plasmodesmal permeability during stress. *Nature Plants*, 2, Article Number: 16034

Eckenwalder JE (1996) Systematics and evolution of *Populus*. In: Settler RF, Bradshaw HD, Heilman PE, Hinckley TM (1996) *Biology of Populus and its Implications for Management and Conservation*. NRC Research Press, Ottawa, Canada, 14-19

Endler A, Kesten C, Schneider R, Zhang Y, Ivakov A, Froehlich A, Funke N, Persson S (2015) A Mechanism for Sustained Cellulose Synthesis during Salt Stress. *Cell*, 162, 1353-1264

Finkelstein RR, Gampala SSL, Rock CD (2002) Abscisic acid signalling in seeds and seedlings. *Plant Cell*, 14, 15-45

Frias I, Caldeira MT, Pérez-Castiñeira JR, Navarro-Aviñó JP, Culiñez-Maciá FA, Kuppinger O, Stransky H, Pages M, Hager A, Serrano R (1996) A major isoform of the maize plasma membrane H⁺-ATPase: Characterization and induction by auxin in coleoptiles. *Plant Cell*, 8, 1533-1544

Kaplan F, Guy CL (2004) β-Amylase induction and the protective role of maltose during temperature shock. *Plant Physiology*, 135, 1674–1684

Kempa S, Krasensky J, Dal Santo S, Kopka J, Jonak C (2008) A central role of abscisic acid in stress-regulated carbohydrate metabolism. *Public Library of Science ONE*, URN: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003935>

Kempken F, Kempken R (2012) Gentechnik bei Pflanzen. Chancen und Risiken. 4. Auflage, Springer Spektrum

Kim SG, Lee AK, Yoon HK, Park CM (2008) A membrane-bound NAC transcription factor NTL8 regulates gibberellic acid-mediated salt signalling in Arabidopsis seed germination. *The Plant Journal*, 55, 77-88

Literatur

- Laskowska-Kosegarten E (2001)** Einfluss von Trocken- und Salzstress auf die Ertragsbildung, die CO₂-Assimilation, das Phytohormonsystem und die Konzentration an Mineralstoffen bei verschiedenen Kulturpflanzen. Dissertation, Gießen, URN: <http://geb.uni-giessen.de/geb/volltexte/2001/535/pdf/d010139.pdf>
- Leple JC, Brasileiro ACM, Michel MF, Delmotte F, Jouranin L (1992)** Transgenic poplars: expression of chimeric genes using four different constructs. *Plant Cell Reports*, 3, 137-141
- Liu X, Widmer A (2014)** Genome-wide Comparative Analysis of the GRAS Gene Family in *Populus*, *Arabidopsis* and *Rice*. *Plant Molecular Biology Reporter*, 32, 1129-1145
- Lu Y, Sharkey TD (2006)** The importance of maltose in transitory starch breakdown. *Plant, Cell and Environment*, 29, 353-366
- Ma HS, Lianxg D, Peng S, Xia XL, Yin WL (2010)** The salt- and drought-inducible poplar GRAS protein SCL7 confers salt and drought tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany*, 61, 4011-4019
- McFarlane HE, Döring A, Persson S (2014)** The Cell Biology of Cellulose Synthesis. *Annual Reviews of Plant Biology*, 65, 69-94
- Miller G, Suzuki N, Ciftci-Yilmaz S, Mittler R (2010)** Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. *Plant, Cell and Environment*, 33, 453-567
- Munns R (2002)** Comparative physiology of salt and water stress. *Plant, Cell and Environment*, 25, 239-250
- Murata N, Takahashi S, Nishiyama Y, Allakhverdiev S (2007)** Photoinhibition of photosystem II under environment stress. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1767, 414-421
- Niittylä T, Messerli G, Trevisan M, Chen J, Smith AM, Zeeman SC (2004)** A previously unknown maltose transporter essential for starch degradation in leaves. *Science*, 303, 87-89
- Papula L (2009)** Mathematische Formelsammlung für Ingenieure und Naturwissenschaftler. 10. Auflage, Vieweg und Teubner, Wiesbaden
- Park HJ, Kim WY, Yun DJ (2016)** A New Insight of Salt Stress Signalling in Plant. *Molecules and Cells*, 6, 447-459
- Pfaffl MW (2004)** Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. *BIOspektrum*, 1, 92-95
- Qadir M, Quillérou E, Nangia V, Murtaza G, Singh M, Thomas RJ, Drechsel P, Noble AD (2014)** Economics of Salt-induced Land Degradation and Restoration. In: *Natural Resources Forum* (27. Oktober 2014)
- Rejeb IB, Pastor V, Mauch-Mani B (2014)** Plant Responses to Simultaneous Biotic and Abiotic Stress: Molecular Mechanisms. *Plants*, 3, 458-475
- Serrano R, Mulet JM, Rios G, Marquez JA, de Larrinoa IF, Leube MP, Medizabal I, Rascual-Ahuir A, Proft M, Ros R, Montesinos (1999)** A glimpse of the mechanisms of ion homeostasis during salt stress. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 50, 1023-1036
- Suzuki S, Li L, Sun YH, Chiang VL (2006)** The Cellulose Synthase Gene Superfamily and Biochemical Functions of Xylem-Specific Cellulose Synthase-Like Genes in *Populus trichocarpa*. *Plant Physiology*, 142, 1233-1245
- Swain SM, Singh DP (2005)** Tall tales from sly dwarves: novel functions of gibberellins in plant development. *Trends Plant Science*, 10, 123-129

Tang RJ, Liu H, Bao Y, Lv QD, Yang L, Zhang HX (2010) The woody plant poplar has a functionally conserved salt overly sensitive pathway in response to salinity stress. *Plant Molecular Biology*, 74, 367-380

Tuskan GA, DiFazio S, Jansson S, Bohlmann J, Grigoriev I, Hellsten U, Putnam N, Ralph S, Rombauts S, Salamov A, Schein J, Sterck L, Aerts A, Bhalerao RR, Bhalerao RP, Blaudez D, Boerjan W, Brun A, Brunner A, Busov V, Campbell M, Carlson J, Chalot M, Chapman J, Chen GL, Cooper D, Coutinho PM, Couturier J, Covert S, Cronk Q, Cunningham R, Davis J, Degroeve S, De ´jardin A, dePamphilis C, Detter J, Dirks B, Dubchak I, Duplessis S, Ehlting J, Ellis B, Gendler K, Goodstein D, Gribskov M, Grimwood J, Groover A, Gunter L, Hamberger B, Heinze B, Helariutta Y, Henrissat B, Holligan D, Holt R, Huang W, Islam-FaridiN, Jones S, Jones-Rhoades M, Jorgensen R, Joshi C, Kangasjärvi J, Karlsson J, Kelleher C, Kirkpatrick R, Kirst M, Kohler A, Kalluri U, Larimer F, Leebens-Mack J, Leple JC, Locascio P, Lou Y, Lucas S, Martin F, Montanini B, Napoli C, Nelson DR, Nelson C, Nieminen K, Nilsson O, Pereda V, Peter G, Philippe R, Pilate G, Poliakov A, Razumovskaya J, Richardson P, Rinaldi C, Ritland K, Rouze P, Ryaboy D, Schmutz J, Schrader J, Segerman B, Shin H, Siddiqui A, Sterky F, Terry A, Tsai CJ, Uberbacher E, Unneberg P, Vahala J, Wall K, Wessler S, Yang G, Yin T, Douglas C, Marra M, Sandberg G, Van de Peer Y, Rokhsar D (2006) The Genome of Black Cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray). *Science*, 313, 1596-1604

West G, Inzé D, Beemster GTS (2004) Cell Cycle Modulation in the Responce oft he Primary Root of *Arabidopsis* to Salt Stress. *Plant Physiology*, 135, 1050-1058

Wühlisch G (2016) Pappeln und Weiden in Deutschland: Bericht der nationalen Pappelkommission 2012-2015. Thünen Working Paper, No. 62

Zhu JK (2002) Salt and Drought Stress Signal Transduction in Plants. *Annual Reviews of Plant Biology*, 53, 247-273

Ziemer P (2008) Die Bedeutung der GRAS-Proteine für die Entwicklung von Pflanzen untersucht am Modellorganismus *Arabidopsis thaliana*. Dissertation, München, URN: https://edoc.ub.uni-muenchen.de/9572/1/Ziemer_Petra.pdf

7. Anhang

A1. Wurzelmasse unter Salzstress

Tabelle 11: **Mittelwerte der Gesamtwurzelrockenmasse unter Salzstress [g]**

Linie	460-Medium + NaCl [M]		
	0	0,05	0,1
P1	0,00125	0,00238	0,00334
N329-1	0,00193	0,00239	0,00264
N329-3	0,00168	0,00277	0,00331
N340-1	0,00237	0,00264	0,00301
N340-6	0,00221	0,00245	0,00328

Tabelle 12: **Standardabweichungen der Gesamtwurzelrockenmasse unter Salzstress**

Linie	460-Medium + NaCl [M]		
	0	0,05	0,1
P1	0,00031	0,00085	0,00058
N329-1	0,00060	0,00126	0,00074
N329-3	0,00129	0,00127	0,00054
N340-1	0,00152	0,00106	0,00139
N340-6	0,00100	0,00115	0,00195

A2. Wurzelmasse unter Trockenstress

Tabelle 13: **Mittelwerte der langenbezogenen Wurzelmasse unter Trockenstress [g/cm]**

Linie	460-Medium + PEG [%]			
	0	1,5	2	2,5
P1	0,00017	0,00033	0,00023	0,00029
N329-1	0,00015	0,00031	0,00045	0,00072
N329-3	0,00026	0,00024	0,00023	0,00035
N340-1	0,00028	0,00024	0,00054	0,00051
N340-6	0,00015	0,00021	0,00025	0,00027

Tabelle 14: **Standardabweichungen der langenbezogenen Wurzelmasse unter Trockenstress**

Linie	460-Medium + PEG [%]			
	460	1,5	2	2,5
P1	0,00009	0,00013	0,00005	0,00015
N329-1	0,00006	0,00012	0,00026	0,00048
N329-3	0,00017	0,00014	0,00007	0,00012
N340-1	0,00016	0,00008	0,00028	0,00012
N340-6	0,00004	0,00004	0,00007	0,00009

Anhang

A3. Höhenwachstum unter Trockenstress

Tabelle 15: **Mittelwerte der Wuchshöhe unter Trockenstress [cm]**

Linie	460-Medium + PEG [%]			
	460	1,5	2	2,5
P1	9,6	11,1	9,4	8,7
N329-1	8,8	8,6	7,8	6,8
N329-3	7,6	10,8	9,0	7,8
N340-1	8,0	8,1	9,3	8,4
N340-6	9,1	7,7	9,3	9,0

Tabelle 16: **Standardabweichungen der Wuchshöhe unter Trockenstress**

Linie	460-Medium + PEG [%]			
	0	1,5	2	2,5
P1	2,0	0,9	1,1	0,1
N329-1	3,4	1,3	1,3	3,1
N329-3	1,9	2,7	2,2	1,7
N340-1	1,3	1,7	1,5	1,6
N340-6	1,6	0,8	1,4	1,4

A4. Wurzellänge unter Trockenstress

Tabelle 17: **Mittelwerte der Wurzellänge unter Trockenstress [cm]**

Linie	460-Medium + NaCl [M]			
	0	1,5	2	2,5
P1	10,43	7,35	7,34	5,47
N329-1	7,10	6,38	4,17	2,70
N329-3	12,38	9,88	9,43	10,65
N340-1	6,06	8,22	6,68	3,94
N340-6	9,18	6,20	5,40	3,40

Tabelle 18: **Standardabweichungen der Wurzellängen unter Trockenstress**

Linie	460-Medium + NaCl [M]			
	0	1,5	2	2,5
P1	4,02	3,82	3,11	3,13
N329-1	2,94	4,46	0,38	0,85
N329-3	5,50	1,79	3,87	2,55
N340-1	2,93	2,21	1,39	3,41
N340-6	3,91	3,70	3,90	1,35

Anhang

Tabelle 19: **Qualität der extrahierten RNA.**

Extinktionen, Konzentrationen und RIN-Werte beziehen sich auf aufgereinigte RNA. Evtl. verbliebene genomische DNA wurde durch eine DNase I verdaut.

Probe				RNA nach DNase-Verdau			
Linie	Art und Dauer der Kultivierung	Ernte	Gewebe	E _{260/280}	E _{260/230}	ng/μL	RIN
N329-1	4 Monate auf 460-Medium + 0,1 M NaCl	13.03.2017	Blatt	1,96	1,70	168,85	7,6
N329-1			Wurzel	1,74	1,06	41,02	7,3
N329-3			Blatt	1,96	1,71	196,96	7,6
N329-3			Wurzel	1,81	1,28	76,40	7,2
N340-6			Blatt	1,93	1,54	122,35	6,8
N340-6			Stengel	1,86	1,36	145,74	7,2
N340-6			Wurzel	1,86	1,34	86,82	7,0
P1			Blatt	1,97	1,74	189,60	6,9
P1			Stengel	1,88	1,51	281,45	7,1
P1			Wurzel	1,92	1,40	74,62	6,4
P1	0 h in 460 Medium + 0,15 N NaCl	28.03.2017	Wurzel	1,80	1,28	54,99	7,6
P1	06h in 460 Medium + 0,15 N NaCl			1,89	1,46	85,85	8,4
P1	12 h in 460 Medium + 0,15 N NaCl			1,94	1,47	124,09	7,9
P1	24 h in 460 Medium + 0,15 N NaCl			1,92	1,27	63,21	8,4
N329-1	12 h in 460 Medium + 0,15 N NaCl			1,59	0,86	41,04	7,6
N329-1	24 h in 460 Medium + 0,15 N NaCl			1,80	1,07	66,58	8,4
N329-3	0 h in 460 Medium + 0,15 N NaCl			1,71	0,98	57,70	8,1
N329-3	06h in 460 Medium + 0,15 N NaCl			1,74	1,04	60,90	8,3
N329-3	12 h in 460 Medium + 0,15 N NaCl			1,81	1,12	74,96	8,1
N329-3	24 h in 460 Medium + 0,15 N NaCl			1,76	1,12	67,14	8,3
N340-1	06h in 460 Medium + 0,15 N NaCl			1,82	1,23	97,29	8,3
N340-1	12 h in 460 Medium + 0,15 N NaCl			1,75	0,83	26,77	8,2
N340-1	24 h in 460 Medium + 0,15 N NaCl			1,76	1,05	74,85	8,1
N340-6	0 h in 460 Medium + 0,15 N NaCl			1,81	1,26	98,19	8,7
N340-6	06h in 460 Medium + 0,15 N NaCl			1,81	0,97	43,75	8,6
N340-6	12 h in 460 Medium + 0,15 N NaCl			1,75	1,09	65,36	8,1
N340-6	24 h in 460 Medium + 0,15 N NaCl			1,81	1,17	59,40	8,8

Anhang

Probe				RNA nach DNase-Verdau					
Linie	Art und Dauer der Kultivierung	Ernte	Gewebe	E _{260/280}	E _{260/230}	ng/μL	RIN		
P1	0 h in 460 Medium + 0,15 N NaCl	28.03.2017	Stengel	2,01	1,84	205,24	8,2		
P1	06h in 460 Medium + 0,15 N NaCl			2,01	1,90	178,83	8,1		
P1	12 h in 460 Medium + 0,15 N NaCl			2,01	1,83	177,84	8,3		
P1	24 h in 460 Medium + 0,15 N NaCl			1,98	1,78	160,06	8,1		
N329-1	0 h in 460 Medium + 0,15 N NaCl			1,96	1,62	130,53	8,4		
N329-1	06h in 460 Medium + 0,15 N NaCl			1,92	1,42	72,89	7,5		
N329-1	12 h in 460 Medium + 0,15 N NaCl			1,89	1,27	55,54	8,1		
N329-1	24 h in 460 Medium + 0,15 N NaCl			1,96	1,66	123,84	8,2		
N340-6	0 h in 460 Medium + 0,15 N NaCl			1,98	1,65	150,62	8,1		
N340-6	06h in 460 Medium + 0,15 N NaCl			1,96	1,62	137,25	8,2		
N340-6	12 h in 460 Medium + 0,15 N NaCl			1,98	1,69	172,29	8,2		
N340-6	24 h in 460 Medium + 0,15 N NaCl			1,97	1,59	139,30	8,4		
P1	Dauerkultur auf 460 Medium			18.04.2017	Wurzel	2,00	1,47	58,40	7,6
P1					Stengel	2,06	2,02	230,76	8,1
N329-1		Wurzel	1,82		0,89	22,86	7,9		
N329-1		Stengel	2,04		2,00	248,79	8,3		
N340-6		Wurzel	2,01		1,58	83,15	7,7		
N340-6		Stengel	2,05		1,81	130,04	7,7		
P1	Seit 03.03.2017 auf 460-Medium + 0,1 M NaCl	11.04.2017	Wurzel	1,89	1,19	51,66	8,0		
P1			Stengel	2,05	1,92	189,03	8,2		
N329-1			Wurzel	2,00	1,05	31,77	7,2		
N329-1			Stengel	1,99	1,65	160,78	8,2		
N340-6			Wurzel	1,91	1,24	85,54	7,5		
N340-6			Stengel	2,00	1,77	178,68	7,6		
P1	Seit 10.04.2017 auf 460-Medium + 2,5% PEG	19.04.2017	Stengel	2,02	2,08	379,90	8,6		
P1			Wurzel	2,01	1,47	73,33	7,0		
N329-1			Wurzel	1,99	1,54	77,11	7,1		
N329-1			Stengel	2,04	1,94	211,73	8,3		
N340-6			Stengel	2,04	2,03	282,44	8,4		
N340-6			Wurzel	2,00	1,36	42,47	7,0		
P1	Sechs Stunden auf Filterpapier, befeuchtet mit 400μL Wasser		Stengel	1,97	1,42	72,34	8,2		
N329-1			Stengel	1,99	1,78	132,24	8,1		
N340-6			Stengel	1,97	1,32	60,52	8,2		

8. Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere hiermit, dass ich die vorliegende Bachelorarbeit mit dem oben angeführten formulierten Thema ohne fremde Hilfe selbstständig verfasst und nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Wörtlich oder dem Sinn nach aus anderen Werken entnommene Stellen sind unter der Angabe der Quellen kenntlich gemacht.

Hamburg, 15.05.2017