

**Anpassung an Trocken- und Salzstress: Untersuchungen an
Modellpflanzen und Extremophilen**



Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Heike Milada Müller

aus Sinsheim

Würzburg 2019

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender:

1. Gutachter: Prof. Dr. Rainer Hedrich

2. Gutachter: Prof. Dr. Arthur Korte

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

**Anpassung an Trocken- und Salzstress: Untersuchungen an
Modellpflanzen und Extremophilen**



Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Heike Milada Müller

aus Sinsheim

Würzburg 2019

Zusammenfassung

Die wahrscheinlich größten Probleme des 21. Jahrhunderts sind der Klimawandel und die Sicherstellung der Nahrungsmittelversorgung für eine steigende Zahl an Menschen. Durch die Zunahme von extremen Wetterbedingungen wie Trockenheit und Hitze wird der Anbau konventioneller, wenig toleranter Nutzpflanzen erschwert und die dadurch notwendige, steigende Bewässerung der Flächen führt darüber hinaus zu einer zusätzlichen Versalzung der Böden mit für Pflanzen toxischen Natrium- und Chlorid-Ionen. Kenntnisse über Anpassungsstrategien salztoleranter Pflanzen an Salzstress, aber auch detailliertes Wissen über die Steuerung der Transpiration und damit des Wasserverlusts von Pflanzen sind daher wichtig, um auch künftig ertragreiche Landwirtschaft betreiben zu können. In dieser Arbeit habe ich verschiedene Aspekte der pflanzlichen Stressphysiologie bearbeitet, die im Folgenden getrennt voneinander zusammengefasst werden.

I. Funktionelle Unterschiede der PYR/PYL-Rezeptoren von Schließzellen

Entscheidend für den Wasserstatus von Pflanzen ist die Kontrolle des Wasserverlusts durch Spaltöffnungen (Stomata), die von einem Paar Schließzellen gebildet werden. Externe Faktoren wie Licht, Luftfeuchtigkeit und CO₂, sowie interne Faktoren wie das Phytohormon Abszinsäure (ABA) regulieren über Signalkaskaden die Stomaweite und dadurch den Wasserverlust. Die zugrunde liegenden Signalkaskaden überlappen teilweise. Vor allem der Stomaschluss durch erhöhtes CO₂ und ABA weisen viele Gemeinsamkeiten auf und die Identifizierung des Konvergenzpunktes beider Signale ist immer noch aktueller Gegenstand der Forschung. Von besonderem Interesse sind dabei die in Schließzellen exprimierten ABA-Rezeptoren der PYR/PYL-Familie. Denn obwohl bislang nicht nachgewiesen werden konnte, dass CO₂ zu einem Anstieg des ABA-Gehalts von Schließzellen führt deuten einige Studien darauf hin, dass die ABA-Rezeptoren selbst am CO₂-Signalweg beteiligt sind.

Durch Untersuchungen der Stomareaktion von Arabidopsis ABA-Rezeptormutanten konnte ich in dieser Arbeit zeigen, dass die in Schließzellen exprimierten ABA-Rezeptoren der PYR/PYL-Familie funktionale Unterschiede aufweisen. Fünffach-Verlustmutanten der ABA-Rezeptoren PYR1, PYL2, 4, 5 und 8 (12458) waren in ihrem ABA-induzierten Stomaschluss beeinträchtigt und nur die Komplementation mit PYL2 und in geringerem Maße PYR1 konnte die ABA-Sensitivität wiederherstellen. Die Stomata von 12458-Verlustmutanten waren außerdem insensitiv gegenüber erhöhtem CO₂, was auf eine Beteiligung der ABA-Rezeptoren am CO₂-induzierten Stomaschluss hindeutet und diese Sensitivität konnte nur durch die Komplementation mit PYL4 oder PYL5, nicht aber mit PYL2 wiederhergestellt werden. Somit

konnten in dieser Arbeit erstmals funktionelle Unterschiede der PYR/PYLs beim Stomaschluss nachgewiesen werden.

Alle externen und internen Stomaschluss-Signale haben außerdem Einfluss auf die Genexpression der Schließzellen und führen zu individuellen expressionellen Adaptionen. In vorangegangenen Microarray Studien konnte gezeigt werden, dass jeder Stimulus auch die Expression eines distinkten Sets an ABA-Rezeptoren beeinflusst. Im Rahmen dieser Arbeit konnte ich außerdem zeigen, dass die Expression der ABA-Rezeptoren bereits auf kleine Änderungen der ABA-Konzentration der Schließzellen reagiert und dass diese sich außerdem in ihrer Sensitivität gegenüber ABA unterscheiden. Geringe Änderungen der ABA-Konzentration von Schließzellen haben demnach Auswirkungen auf deren Rezeptorzusammensetzung. Darüber hinaus konnte ich zeigen, dass die Rezeptoren die Expression unterschiedlicher nachgeschalteter Gene beeinflussen, was darauf hindeutet, dass Anpassungen des Rezeptorpool durch geringe Änderungen des ABA-Gehalts von Schließzellen schlussendlich auf genexpressioneller Ebene zur längerfristigen Adaption an externe Bedingungen führen und die Rezeptoren auch hier funktional verschieden sind.

II. Stomatäre Besonderheiten der toleranten Dattelpalme (*Phoenix dactylifera*)

Dattelpalmen kommen natürlicherweise an besonders trockenen und heißen Standorten vor, an denen es aufgrund der harschen Bedingungen nur sehr wenigen Pflanzen möglich ist überhaupt zu wachsen. Ein naheliegender Grund für die herausragende Toleranz dieser Art gegenüber wasserlimitierenden Bedingungen ist eine Anpassung der stomatären Regulation zu Gunsten des Wasserhaushalts.

In dieser Arbeit konnte ich durch vergleichende Untersuchungen der lichtabhängigen Transpiration sowie dem ABA-induzierten Stomaschluss grundlegende Unterschiede in der Stomaphysiologie der Dattelpalmen und der eher sensiblen Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* nachweisen. Blattgaswechselformen zeigten, dass Dattelpalmen in der Lage sind die Spaltöffnungen bei niedrigen Lichtintensitäten, bei denen *Arabidopsis* bereits deutlich geöffnete Stomata aufwies, geschlossen zu halten. Der bedeutendste Unterschied in der Stomaphysiologie von Dattelpalmen und *Arabidopsis* lag aber im ABA-induzierten Stomaschluss. Während über die Petiole verabreichtes ABA bei *Arabidopsis* innerhalb von 15 Minuten zu einem vollständigen Stomaschluss führte, konnte ich in dieser Arbeit zeigen, dass der ABA-induzierte Stomaschluss der Datteln nitratabhängig ist. ABA allein führte nur zu einem sehr langsamen Stomaschluss der innerhalb einer Stunde nicht vollständig abgeschlossen war. Nur in Gegenwart von Nitrat führte die ABA-Gabe in den Transpirationsstrom der Fiederblätter der Datteln zu einem schnellen und vollständigen Stomaschluss. In *Arabidopsis* wird der in Schließzellen vorkommende Anionenkanal AtSLAC1 durch eine über den ABA-

Signalweg vermittelte Phosphorylierung aktiviert, was schlussendlich zur Aktivierung spannungsabhängiger Kationenkanäle und zum Ausstrom von Kalium aus den Schließzellen führt. Es konnte gezeigt werden, dass die Nitratabhängigkeit der ABA-Antwort der Schließzellen von Dattelpalmen auf Eigenschaften von PdSLAC1 zurückzuführen ist und dieser Kanal nur in Anwesenheit von extrazellulärem Nitrat aktivierbar ist. Mittlerweile konnte, unter anderem basierend auf diesen Ergebnissen, eine Tandem-Aminosäuresequenz identifiziert werden, die die SLAC-Homologe monokotyler Pflanzen wie der Dattelpalme von der dikotyler Pflanzen unterscheidet und zumindest teilweise für die nitratabhängige Aktivierung des Stomaschlusses vieler monokotyler verantwortlich ist.

III. Die Salztoleranz von *Phoenix dactylifera* und *Chenopodium quinoa*

Sowohl Dattelpalmen als auch *C. quinoa* weisen, verglichen mit den meisten anderen Pflanzen, eine hohe Toleranz gegenüber NaCl-haltigen Böden auf. In dieser Arbeit habe ich die Salztoleranz beider Arten untersucht, um so Strategien zu identifizieren, die diesen Pflanzen diese gesteigerte Toleranz ermöglichen.

Dattelpalmen können natürlicherweise auf salzigen Böden wachsen. Makroskopisch weisen diese Pflanzen aber keine Anpassungen wie bspw. Salzdrüsen auf und bislang ist unklar wie Dattelpalmen mit dem NaCl aus dem Boden umgehen. In dieser Arbeit konnte ich zeigen, dass der Natriumgehalt der Fiederblätter der Datteln durch eine sechswöchige Bewässerung mit 600mM NaCl, was ungefähr der Konzentration von Meerwasser entspricht, nicht zunimmt. Demnach sind Datteln so genannte „Exkluder“, also Pflanzen, die eine übermäßige Natriumaufnahme in photosynthetisch aktives Gewebe vermeiden. Der Natriumgehalt der Wurzeln dagegen nahm unter Salzstress aber zu. Diese Zunahme war allerdings in unterschiedlichen Bereichen der Wurzeln verschieden stark. Flammenphotometrische Messungen ergaben einen vom Wurzelansatz ausgehenden graduellen Anstieg des Natriumgehalts, der an der Wurzelspitze am höchsten war. Darüber hinaus konnte eine Induktion von PdSOS1, einem putativen Na⁺/H⁺-Antiporter in diesen unteren, natriumhaltigen Bereichen nachgewiesen werden. Eine hohe SOS1-Aktivität gilt bereits in anderen toleranten Arten als Schlüsselmerkmal für deren Toleranz und die gesteigerte Expression von PdSOS1 deutet auf eine erhöhte Natrium-Exportrate aus der Wurzel zurück in den Boden in diesen unteren Bereichen hin, was schlussendlich den Ausschluss von Natrium vermitteln könnte.

In sensitiven Arten führt Salzstress häufig zu einer Abnahme der Kaliumkonzentration des Gewebes. Interessanterweise war dies weder für das Blatt- noch das Wurzelgewebe der Dattelpalmen der Fall. Der Kaliumgehalt beider Gewebe blieb trotz der Bewässerung der Pflanzen mit Salzwasser konstant. Auf expressioneller Ebene konnte ich darüber hinaus zeigen, dass PdHAK5, ein putativer hochaffiner Kaliumtransporter, der unter

Kontrollbedingungen überwiegend in den oberen Wurzelabschnitten exprimiert wurde, durch den Salzstress dort reprimiert wurde. PdKT, ebenfalls ein putatives Kalium-Transportprotein dagegen, wurde nicht durch die Salzbehandlung beeinflusst, was zusammengenommen darauf hindeutet, dass das Aufrechterhalten des Kaliumgehalts bei Salzstress durch die differentielle Regulation verschiedener Kaliumaufnahme-systeme gewährleistet wird. Der effiziente Ausschluss von Natrium zusammen mit dem hohen K^+/Na^+ -Verhältnis könnten demnach Schlüsselmerkmale für die hohe Salztoleranz von *Phoenix dactylifera* darstellen.

Quinoa ist, ähnlich wie die Dattelpalme, eine salztolerante Nutzpflanze. Im Gegensatz zu Dattelpalmen weist Quinoa allerdings besondere Strukturen auf der Epidermis auf, die so genannten epidermalen Blasenhaare (englisch: *epidermal bladder cells*, EBCs). Die Funktion dieser ballonartig vergrößerten Zellen als externe Salzspeicher wird seit längerem diskutiert.

Flammenphotometrische Messungen des Natriumgehalts von Quinoa unter Salzstressbedingungen ergaben, dass Quinoa anders als Dattelpalmen, Natrium in die oberirdischen, photosynthetisch aktiven Organe aufnimmt. Auch die Zunahme des Natriumgehalts der EBCs konnte ich nachweisen. Junge Blätter haben eine hohe Dichte an intakten EBCs, was deren Funktion als externe Salzspeicher besonders zum Schutz dieser jungen Blätter nahelegt. mRNA-Sequenzierungen ergaben darüber hinaus, dass die EBCs bereits unter Kontrollbedingungen viele in grundlegende Stoffwechselprozesse involvierte Gene sowie membranständige Transportproteine differentiell exprimieren. Diese Unterschiede im Transkriptom der EBCs zum Blattgewebe zeigen, dass katabole Stoffwechselwege nur eine untergeordnete Rolle in den hochspezialisierten EBCs spielen und deren Stoffwechsel auf dem Import energiereicher Zucker und Aminosäuren basiert.

Mittels qPCR-Messungen und RNA-Sequenzierungen konnte ich die gewebespezifische Expression verschiedener Transportproteine nachweisen, die eine gerichtete Aufnahme von Natrium in EBCs ermöglichen könnten. Besonders die differentielle Expression eines Natriumkanals der HKT1-Familie deutet auf dessen Beteiligung an der Natriumbeladung der EBCs hin. CqHKT1.2 wurde ausschließlich in EBCs exprimiert und die elektrophysiologische Charakterisierung dieses Transportproteins ergab eine spannungsabhängige Natriumleitfähigkeit. Dieser Natriumkanal kann demnach die Natriumaufnahme bei Membranspannungen nahe dem Ruhepotential in die EBCs vermitteln und die Deaktivierung des CqHKT1.2 bei depolarisierenden Membranspannungen kann darüber hinaus einen Efflux von Na^+ aus den EBCs verhindern. Auch das Expressionsmuster eines putativen Na^+/H^+ -Antiporters (CqSOS1) der nur sehr gering in EBCs aber deutlich höher in Blattgewebe exprimiert wurde, deutet auf eine indirekte Beteiligung dieses SOS1 an der Beladung der EBCs hin. Bereits charakterisierte SOS1-Proteine anderer Pflanzen zeigten unter

physiologischen Bedingungen eine Natriumexport-Aktivität. CqSOS1 könnte demnach den Export von Natrium aus Mesophyll- und Epidermiszellen der Blätter in den Apoplasten vermitteln, welches dann über CqHKT1.2 in die EBCs aufgenommen wird.

Trotz der Natriumaufnahme in die oberirdischen Teile und die EBCs führte die Salzbehandlung ähnlich wie bei den Datteln nicht zu einer Abnahme des bemerkenswert hohen Kaliumgehalts. Mittels qPCR-Untersuchungen konnte ich die Expression verschiedener HAK-Orthologe nachweisen, deren Aktivität die Aufrechterhaltung des Kaliumgehalts unter Salzstress vermitteln könnten. Frühere Studien konnten zeigen, dass Salzstress bei Quinoa wie bei vielen salztoleranten Arten zu einem Anstieg der Konzentration von kompatiblen gelösten Substanzen und besonders von Prolin führt. In dieser Arbeit konnte ich die hohe Expression eines Prolintransporters in EBCs nachweisen, was eher auf einen importbasierten Anstieg der Prolinkonzentration als auf die Synthese innerhalb der EBCs schließen lässt.

Zusammengefasst ergaben der Anstieg des Natriumgehalts der EBCs in Verbindung mit den Ergebnissen der RNA-Sequenzierung und den ergänzenden qPCR Messungen, dass die EBCs von Quinoa bereits unter Kontrollbedingen für die Aufnahme von überschüssigen Ionen unter Salzstress spezialisierte Zellen sind, deren Spezialisierung auf dem Import von energiereichen Zuckern und anderen Substanzen basiert.

Summary

The greatest problem faced by the 21st century are climate change and maintaining the food security for an increasing number of people. The increase in extreme weather events, such as drought and heat, makes it difficult to cultivate conventional crops that are not stress tolerant. As a result, increasing irrigation of arable land leads to additional salinization of soils with plant-toxic sodium and chloride ions. Knowledge about the adaptation strategies of salt-tolerant plants to salt stress as well as detailed knowledge about the control of transpiration and thus of the water loss of these plants are therefore important in order to be able to guarantee productive agriculture in the future. In this work, I have worked on various aspects of plant stress physiology, which will be summarized separately below.

1. Functional differences of guard cell PYR / PYL receptors

A tight regulation of the transpirational water loss through stomata, which are formed by a pair of guard cells, is crucial for regulating the water status of plants. External factors such as light, humidity and CO₂ as well as internal factors such as the phytohormone ABA regulate the stoma width and thus the loss of water via individual signal cascades. However, the underlying signaling cascades partly overlap. In particular, the cascades involved in stomatal closure due to increasing CO₂ and ABA overlap and the identification of a convergence point of both signals is still the subject of ongoing research. In this context, the ABA receptors of the PYR/PYL family that are expressed in guard cells are of particular interest. Although it has not yet been demonstrated that CO₂ leads to an increase in the ABA content of guard cells, some studies indicate that the ABA receptors themselves are involved in the CO₂ signaling pathway

By studying the stomatal response of Arabidopsis ABA receptor mutants, I demonstrated that the PYR / PYL family ABA receptors expressed in guard cells show functional differences. Pentuple knock out mutants of the ABA receptors PYR1, PYL2, 4, 5, and 8 (12458) showed impairment in ABA-induced stomatal closure, and only complementation with PYL2 and, to a lesser extent, PYR1 could restore ABA sensitivity. Additionally, the stomata of the 12458 knockout mutants were also insensitive to elevated CO₂ and the sensitivity could only be restored by the complementation with the receptors PYL4 and PYL5 suggesting an involvement of the ABA receptors in the CO₂-induced stomatal closure.

Furthermore, all external and internal stimuli that lead to stomatal closure influence the gene expression of guard cells leading to individual adaptations on the gene expression level. Previous microarray studies have shown that each stimulus also affects the expression of a distinct set of ABA receptors. In this work, I showed that the expression of ABA receptors already responded to small changes in the ABA concentration of guard cells and that the

receptor expression also differed in their sensitivity to ABA. Small changes in the ABA concentration of guard cells could therefore influence their receptor composition. In addition, I was able to show that the receptors affect the expression of different downstream genes, suggesting that adjustments of the receptor pool by small changes in the ABA content of guard cells ultimately lead to long-term adaptations to external conditions at the gene expression level.

II. Specific features of the stomata of the extremely tolerant date palm (*Phoenix dactylifera*)

Date palms naturally occur in particularly dry and hot locations, where due to the harsh conditions only very few plant species are able to grow at all. One possible reason for the outstanding tolerance of this species to water-limiting conditions is an adaptation of the stomatal regulation in favor of maintaining water balance.

In this work, I was able to demonstrate fundamental differences in the stomatal physiology of date palm and the rather sensitive model plant *Arabidopsis thaliana* by comparative studies of light-dependent transpiration and ABA-induced stoma closure. Leaf gas exchange measurements showed that date palm can keep the stomata closed at low light intensities, where *Arabidopsis* already had clearly opened stomata. However, the most significant difference in the stomatal physiology between date palm and *Arabidopsis* was found in the ABA-induced stomatal closure. While ABA fed via the petiole resulted in complete stomatal closure within 15 minutes in *Arabidopsis*, I showed that ABA-induced stomatal closure is nitrate-dependent in date palm. ABA alone only resulted in a very slow stomatal closure that was not fully completed within one hour. Only in the presence of nitrate did the feeding of ABA into the transpiration stream of date palm pinates lead to a rapid and complete stomatal closure. In *Arabidopsis*, the guard cell-expressed anion channel AtSLAC1 is activated by ABA signaling-mediated phosphorylation, triggering voltage-dependent cation channels to open and ultimately channeling potassium out of the guard cells. It could be shown that the nitrate dependence of the ABA response of the date palm guard cells is due to properties of PdSLAC1 and that this channel can only be activated in the presence of extracellular nitrate. Based on these results, a tandem amino acid sequence has now been identified, that distinguishes the SLAC homologues of monocotyledonous plants (including date palm) from dicotyledonous plants (including *Arabidopsis*) and is at least partially responsible for the nitrate-dependent activation of the stoma conductance of many monocots.

III. The strategies behind the salt tolerance of *P. dactylifera* and *Chenopodium quinoa*

Both date palms and *C. quinoa* have a high tolerance to NaCl-containing soils compared to most other plant species. In this work, I studied the salt tolerance of both species to identify strategies that allow these plants to grow under salt stress conditions.

Date palm naturally grows on saline soils along the coast of the Arabian Peninsula. However, they do not possess any macroscopic adaptations such as salt glands. So far it is unclear how date palms handle excessive NaCl from the soil. In this work, I was able to show that the sodium content of date palm pinates does not increase after a six-week irrigation with 600mM NaCl, which is roughly the concentration of seawater. Accordingly, date palm is a so-called "excluder", i.e. a plant that avoids excessive sodium uptake into photosynthetically-active tissue. The sodium content of roots, however, increased under salt stress. But this increase was different in different areas of the roots. Flame photometric measurements revealed a gradual increase in sodium content from upper to lower parts of the roots, which was highest at the root tip. In addition, induction of PdSOS1, a putative Na⁺/H⁺ antiporter in these lower sodium-containing regions has been demonstrated. High SOS1 activity is already considered to be a key feature of tolerance in other species, and increased expression of PdSOS1 indicates increased sodium export rates from the root back into the soil in these lower areas, which could ultimately mediate the exclusion of sodium.

In sensitive plant species, salt stress often leads to a decrease in the potassium concentration of the tissue. Interestingly, this was not the case for date palm leaf or root tissue. The potassium content of both tissues remained constant despite irrigation of the plants with salt water. On the expression level, I also showed that PdHAK5, a putative high-affinity potassium transporter predominantly expressed in the upper root sections under control conditions, was repressed by the salt stress there. In contrast, PdKT, also a putative potassium transport protein, was not affected by the salt treatment, suggesting that maintenance of potassium content in salt stress is ensured by the differential regulation of various potassium uptake systems. The efficient exclusion of sodium together with the high K⁺/Na⁺ ratio could therefore be key features of the high salt tolerance of *Phoenix dactylifera*.

Quinoa, like the date palm, is a salt-tolerant crop but in contrast to date palms quinoa has special structures on the epidermis, the so-called epidermal bladder cells (EBCs). The function of these balloon-like enlarged cells as external salt dumpers has been proposed.

Flame photometric measurements of the sodium content of quinoa under salt stress conditions showed that quinoa, unlike date palm, absorbs sodium in the above-ground, photosynthetically active parts. I was also able to prove the increase in the sodium content of the EBCs. Young

leaves are equipped with a high density of intact EBCs, suggesting their function as external salt stores, especially for the protection of these young leaves. In addition, mRNA sequencing revealed that the EBCs, already under control conditions, differentially express many genes involved in basic metabolic processes as well as membrane-bound transport proteins. These differences in the transcriptome of EBCs to leaf tissue show that catabolic pathways such as photosynthesis play only a minor role in the highly specialized EBCs and their metabolism is based on the import of high energy compounds such as sugars or amino acids.

Using qPCR measurements and RNA sequencing, I was able to demonstrate the tissue-specific expression of various transport proteins, which could allow unidirectional uptake of sodium in EBCs. In particular, the differential expression of a sodium channel of the HKT1 family indicates its involvement in the sodium loading of the EBCs. CqHKT1.2 was expressed exclusively in EBCs and the electrophysiological characterization of this transport protein revealed a voltage-dependent sodium conductivity. Thus, this sodium channel can mediate sodium uptake into EBCs at normal membrane voltages, and deactivation of CqHKT1.2 at depolarized membrane voltages can prevent efflux of Na⁺ out of the EBCs. The expression pattern of a putative Na⁺/H⁺ antiporter (CqSOS1), which is expressed only very low in EBCs but significantly higher in leaf tissue, indicates an indirect involvement of this SOS1 in the loading of the EBCs. SOS1 proteins from other plant species that have already been characterized showed a sodium export activity under physiological conditions. Thus, CqSOS1 could mediate the export of sodium from mesophyll and epidermis cells of the leaves in the apoplasts, which is then absorbed into the EBCs via CqHKT1.2. Similar to the results of date palm, the sodium uptake into the above ground parts and the EBCs of quinoa during the salt treatment did not lead to a decrease in the remarkably high potassium content of quinoa. Using qPCR studies, I was able to demonstrate the expression of various HAK orthologues, the activity of which could mediate the maintenance of potassium levels under salt stress. Previous studies have shown that salt stress in quinoa, as in many tolerant species, leads to an increase in the concentration of compatible solutes and particularly proline. In this work, I was able to demonstrate the high expression of a proline transporter in EBCs, suggesting an import-based increase in proline concentration rather than synthesis within the EBCs.

In summary, the increase in sodium in EBCs together with the RNA-Seq analyses and the complementary qPCR measurements revealed that the Quinoa EBCs under control conditions are already equipped for the uptake of excess ions under salt stress, with a metabolism that strongly depends on the import of high-energy compounds such as sugars and amino acids.

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG.....	15
1.1 Gemeinsamkeiten und Unterschiede von Salz- und Trockenstress	16
1.2 Kontrolle des Wasserverlusts der Blätter.....	17
1.3 Die Rolle der Stomata	18
1.3.1 Stomaöffnung.....	19
1.3.2 Stomaschluss.....	20
1.3.3 Die Rolle von ABA beim Stomaschluss	20
1.3.4 Die Spezifität des ABA-Signalwegs.....	22
1.3.5 Zielsetzung I: Die funktionelle Spezifität der ABA-Rezeptoren in Schließzellen von <i>Arabidopsis thaliana</i>	26
1.4 Spezialisten an extremen Standorten: Stomatäre Anpassungen von <i>Phoenix</i> <i>dactylifera</i>	27
1.4.1 Zielsetzung II: Charakterisierung der Stomaphysiologie von <i>Phoenix dactylifera</i>	29
1.5 Anpassungen an Ionentoxizität bei Salzstress	29
1.5.1 Anionen-Transportsysteme	31
1.5.2 Kationen-Transportsysteme	32
1.5.3 Das K ⁺ /Na ⁺ -Verhältnis	35
1.5.4 Kompatible gelöste Substanzen.....	36
1.6 Die Salztoleranz von <i>P. dactylifera</i> und <i>C. quinoa</i>	39
1.6.1 <i>Phoenix dactylifera</i>	39
1.6.2 <i>Chenopodium quinoa</i>	40
1.6.3 Die Rolle von Blasenhaaren bei der Salztoleranz von <i>Chenopodium quinoa</i>	42
1.6.4 Die Beladung von Blasenhaaren mit Na ⁺ - und Cl ⁻ -Ionen.....	42
1.6.5 Zielsetzung III: Untersuchungen der NaCl-Toleranzmechanismen von <i>C. quinoa</i> und <i>P. dactylifera</i>	44
2. MATERIAL UND METHODEN.....	47
2.1 Pflanzenanzucht.....	47
2.1.1 Anzucht von <i>Arabidopsis thaliana</i>	47
2.1.2 Anzucht von <i>Chenopodium quinoa</i>	50
2.1.3 Anzucht von <i>Phoenix dactylifera</i>	50
2.2 Flammenphotometrie.....	51
2.2.1 Flammenphotometrische Messungen an <i>C. quinoa</i>	52
2.2.2 Flammenphotometrische Messungen an <i>P. dactylifera</i>	54
2.3 Blattgaswechselfmessungen.....	55
2.3.1 Messprinzip	55
2.3.2 Berechnung verschiedener Photosynthese-Parameter	58

2.3.3 Gaswechselfmessungen an <i>Arabidopsis thaliana</i>	58
2.3.4 Vergleichende Gaswechselfmessungen an <i>Phoenix dactylifera</i> und <i>Arabidopsis thaliana</i>	59
2.4 Chlorophyllfluoreszenzmessungen	60
2.5 Molekularbiologische Methoden.....	60
2.5.1 Prinzip und Zielsetzung der qPCR	60
2.5.2 RNA Isolation aus pflanzlichem Gewebe	61
2.5.3 DNase-Verdau und RNA-Fällung	62
2.5.4 RNA-Sequenzierung der Quinoa mRNAs.....	63
2.5.5 Reverse Transkription der mRNA	63
2.5.6 Durchführung und Auswertung der qPCR Messungen.....	64
2.5.7 Primerdesign	65
2.5.8 DNA Agarose-Gelelektrophorese.....	66
2.6 Lichtmikroskopie	67
2.7 Statistische Auswertung	67
3. ERGEBNISSE	69
3.1 Die Funktion der PYR/PYL ABA-Rezeptoren in Schließzellen.....	69
3.1.1 Funktionelle Unterschiede der PYR/PYL-Rezeptoren beim Stomaschluss	71
3.1.2 ABA-abhängige PYR/PYL-Expression in <i>Arabidopsis</i> Schließzellen	76
3.1.3 Funktionelle Unterschiede der PYR/PYL-Rezeptoren auf transkriptioneller Ebene	79
3.2 Dattelstomata unterscheiden sich in ihrer Reaktion auf externe und interne Stimuli von <i>Arabidopsis</i>	82
3.3 Salzstress	86
3.3.1 Sind Dattelpalmen Salz-Exkluder?	86
3.3.2 Salzaufnahme und Lokalisation in <i>Phoenix dactylifera</i>	86
3.3.3 Expressionsänderungen in Wurzeln von <i>Phoenix dactylifera</i> unter Salzstress .	88
3.3.4 Salzaufnahme und Lokalisation in <i>Chenopodium quinoa</i>	91
3.3.5 Expressionsänderungen in epidermalen Blasenhaaren von Quinoa unter Salzstress.....	95
3.3.6 Im Transkriptom von EBCs dominieren katabole Stoffwechselwege	105
4. DISKUSSION	108
4.1 ABA-Rezeptoren in Schließzellen von <i>Arabidopsis thaliana</i>	110
4.1.1 ABA und CO ₂	111
4.1.2 ABA-Rezeptoren und Signalspezifität	112
4.1.3 Transkriptionelle Regulation durch ABA-Rezeptoren	115
4.1.4 Ausblick PYR/PYL-Rezeptoren	116
4.2 Stomata von Dattelpalmen sind an extreme Standorte angepasst.....	117
4.2.1 Die Stomata von Dattelpalmen öffnen erst bei hohen Lichtintensitäten.....	117
4.2.2 Der ABA-induzierte Stomaschluss von Dattelpalmen benötigt Nitrat.....	118

4.2.3 Morphologische Anpassungen der Stomata von <i>Phoenix dactylifera</i>	121
4.2.4 Ausblick.....	122
4.3 Die Salztoleranz von Dattelpalmen.....	122
4.3.1 Natriumausschluss als Schlüssel zur Salztoleranz in Dattelpalmen?	123
4.4 Die Funktion der Blasenhaare von <i>Chenopodium quinoa</i>	125
4.4.1 Natriumgehalt und Natriumaufnahme in EBCs	126
4.4.2 Kalium und Kaliumaufnahme in EBCs	128
4.4.3 Die Aufnahme von Anionen in EBCs.....	129
4.4.4 Import von kompatiblen Soluten in EBCs.....	131
4.4.5 Energiehaushalt in EBCs.....	132
4.4.6 Ausblick.....	133
5. LITERATURVERZEICHNIS	135
6. ANHANG.....	156
6.1 Anhang A: Primer	156
6.2 Anhang B: Abbildungsverzeichnis.....	158
6.3 Anhang C: Tabellenverzeichnis	160
6.4 Anhang D: Quinoa mRNA-Sequenzierungs Daten.....	161
6.5 Anhang E: Abkürzungsverzeichnis	162
7. EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG UND DANKSAGUNG.....	163
7.1 Eidesstattliche Erklärung §7 Abs. 2 Satz 3, 4, 5 der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie.....	163
7.2 Danksagung.....	164

1. Einleitung

Eines der größten globalen Probleme des 21. Jahrhunderts ist die Gewährleistung der Nahrungsmittelsicherheit bei dramatisch steigenden Bevölkerungszahlen (hauptsächlich in Entwicklungsländern) in einer sich klimatisch wandelnden Welt (FAO 2017). Um die Nahrungsmittelversorgung für die zunehmende Bevölkerung zu sichern, muss die Nahrungsmittelproduktion bis 2050 um 70% im Vergleich zu 2006 steigen (Bruinsma 2009). Diese Erhöhung der Produktivität muss trotz des sich ändernden Klimas gewährleistet werden. Wesentliche Punkte des Klimawandels, die einen Einfluss auf die Nahrungsmittelproduktion haben, sind steigende Temperaturen und veränderte Niederschlagsmengen, die in extremen Trocken- und Überflutungsperioden resultieren. Zwischen 1951 und 2012 stieg die jährliche Durchschnittstemperatur um 0.7°C und bis zum Jahr 2060 wird ein weiterer Temperaturanstieg zwischen 0.5°C und 3°C prognostiziert (IPCC 2014). Zusätzlich ändern sich auch die jährlichen Niederschlagsmengen und vor allem in ohnehin ariden Gebieten nehmen diese noch weiter ab (IPCC 2014). Darüber hinaus wird der Großteil des prognostizierten Bevölkerungswachstums in genau diesen Gebieten (vor allem in Afrika) stattfinden. Um trotzdem eine ausreichende Versorgung mit Nahrungsmitteln sicherzustellen, muss die Nahrungsmittelproduktion global, aber besonders in diesen Regionen deutlich gesteigert werden, was unter anderem mit einer Anpassung der Landwirtschaftsflächen einhergehen muss.

Dabei ist ein Ausweiten der landwirtschaftlichen Nutzflächen nur bedingt möglich. Schon heute beträgt die landwirtschaftlich genutzte Fläche 38% des globalen eisfreien Festlandes und deckt damit bereits den größten Teil der (heute) landwirtschaftlich nutzbaren Flächen ab (Foley et al. 2011). Teile dieser Agrarflächen werden (vor allen in semi-ariden Gebieten) bewässert, um sie landwirtschaftlich nutzbar zu machen. Schon heute bedeutet das 85% des jährlich globalen Frischwasserverbrauchs (Foley et al. 2005). Die künstliche Bewässerung bringt darüber hinaus weitere Probleme mit sich. Sowohl durch den Eintrag von hauptsächlich NaCl, als auch durch das Lösen von sich im Boden befindenden Salzen leiden bereits 11% der bewässerten Flächen (Stand 2011) an Versalzung (FAO 2011).

Das grundlegende Verständnis der Anpassungsmechanismen von Pflanzen an Trockenheit und salzige Böden auf molekularer Ebene ist daher dringend notwendig, um z.B. durch gezielte Züchtung von Kulturpflanzen die Nahrungsmittelversorgung in Zukunft an den gesteigerten Bedarf anpassen zu können. Für die Untersuchung der zugrunde liegenden Mechanismen werden derzeit nicht nur stress-sensitive Modellpflanzen wie *Arabidopsis thaliana*, sondern auch stresstolerante Pflanzen eingesetzt, da die Anpassung dieser Pflanzen häufig auf einer effizienteren Nutzung und Abwandlung bereits vorhandener Mechanismen beruht (Munns and Tester 2008).

1.1 Gemeinsamkeiten und Unterschiede von Salz- und Trockenstress

Bedingt durch den Klimawandel werden vor allem Trockenheit und der daraus resultierende Trockenstress in Zukunft in vielen landwirtschaftlich erschlossenen Gebieten zunehmen, was schlussendlich durch gesteigerte Bewässerung auch zu steigender Salzbelastung der Böden und damit auch der Pflanzen führt (FAO 2017). Die Toleranz der angebauten Nutzpflanzen gegenüber diesen Stressfaktoren wird deshalb auch über die zukünftige Nahrungsmittelversorgung entscheiden.

Für Pflanzen, als sessile Organismen, war die Fähigkeit zur Adaption an sich ändernde externe Bedingungen schon immer von extremer Wichtigkeit. Im Laufe der Entwicklung haben deshalb alle höheren Landpflanzenarten Mechanismen entwickelt, die eine Anpassung an variierende Umweltbedingungen erlauben. Die Anpassungsfähigkeit der einzelnen Arten ist dabei individuell unterschiedlich aber auch entscheidend für die jeweilige Stresstoleranz einer Pflanze. Neben biotischen Stressfaktoren wie Pathogenbefall müssen sich Pflanzen vor allem an abiotische Stressfaktoren anpassen. Zu letzteren zählen neben Nährstoffmangel, Hitze und Kälte auch Trockenheit und Salzstress (Zhu 2016). Die meisten dieser Faktoren haben einen negativen Einfluss auf den Wasserhaushalt von Pflanzen (Wang et al. 2003) und die Anpassung an eine wechselnde Wasserverfügbarkeit war daher von besonderer Bedeutung bei der Entwicklung der Pflanzen (Monneveux und Belhassen 1997).

Bei Trockenheit sinkt das Wasserpotential (Ψ) im Boden so weit ab, dass über die Wurzeln weniger Wasser aufgenommen werden kann als die oberirdischen Pflanzenteile verlieren. Dieser osmotische Stress führt zum Turgorverlust der Zellen und schließlich zur Welke (Hsiao 1973). Genau wie in trockenen Böden ist auch das Wasserpotential salziger Böden erniedrigt, was die Aufnahme von Wasser über die Wurzeln ebenfalls erschwert (Munns 2002). Aufgrund dieser teilweise ähnlichen Natur von Trocken- und Salzstress sind viele physiologische Reaktionen und Anpassungsmechanismen eng verwandt und auch die zugrunde liegenden Signalwege überlappen (Zhu 2002, Sah et al. 2016). Eine strenge und effiziente Kontrolle des Wasserverlusts ist deshalb wesentlicher Bestandteil der Adaption an osmotischen Stress und mitentscheidend über die Toleranz der jeweiligen Arten (siehe 1.2-1.4). Kenntnisse über die molekularen Grundlagen der Regulation des Wasserverlusts sind deshalb notwendig, um Nutzpflanzen zu züchten, die auch zukünftig ausreichend Ertrag liefern (Hedrich und Shabala 2018).

Im Fall von Salzstress wird das Wasserpotential des Bodens durch eine hohe Konzentration an Ionen (vor allem Na^+ und Cl^-) abgesenkt. Dies kann zusätzlich zu osmotischem Stress, vor allem bei längerem Wachstum auf salzigen Böden auch zu so genanntem ionischem Stress durch Ionentoxizität führen, indem die Na^+ - und Cl^- -Konzentration im Zytosol durch exzessive

Aufnahme dieser Ionen übermäßig zunimmt. Die Toleranz von Pflanzen gegenüber Salzstress beruht daher außerdem auf Anpassungen an diese Ionentoxizität (Munns 2002; Flowers et al. 2015). Und auch wenn die Salztoleranz von Pflanzen durch eine Vielzahl von Eigenschaften vermittelt wird (Parida und Das 2005; Shabala 2013), so werden viele dieser Adaptionen, wie beispielsweise der Rücktransport der überschüssigen Ionen in den Boden sowie der Ausschluss der toxischen Ionen aus dem Zytosol durch die Kompartimentierung in die Vakuolen, durch kontrollierte Transportvorgänge über Membranen vermittelt (siehe 1.5-1.6). Um zukünftig die Toleranz von Nutzpflanzen gegenüber hohen Salzkonzentrationen im Boden erhöhen zu können, ist auch das Wissen über die Besonderheiten der zugrundeliegenden Transportvorgänge elementar und diese können nur durch die Forschung an toleranten Arten identifiziert werden (Munns und Tester 2008; Shabala 2013).

In der vorliegenden Arbeit wurden deshalb unterschiedliche Aspekte der Stressphysiologie von Pflanzen durch Studien an verschiedenen Arten bearbeitet. Dabei lagen die Schwerpunkte zum einen auf der Adaption salztoleranter Arten an Salzstress und zum anderen auf den molekularen Mechanismen und der Kontrolle der stomatären Wasserverlusts. Daher werden im Folgenden beide Themengebiete separat eingeleitet.

1.2 Kontrolle des Wasserverlusts der Blätter

Trockenstress beeinflusst die Entwicklung von Pflanzen auf nahezu allen physiologischen Ebenen und die Adaptionstrategien sind vielfältig (Yordanov et al. 2000). Wesentlicher Bestandteil der Adaption an Trockenstress ist die Minimierung des Wasserverlusts über die Oberfläche. So weisen besonders trockenresistente Pflanzen häufig eine gewisse Sukkulenz und eine reduzierte Blattfläche auf (Males 2017). Außerdem besitzen höhere Landpflanzen eine Kutikula sowie eine epikutikuläre Wachsschicht, welche einen Großteil der Verdunstung von Wasser aus dem Pflanzengewebe verhindert (Riederer 2007). Die Kutikula sowie die Zusammensetzung der epikutikulären Wachsschicht ist von Spezies zu Spezies verschieden und hat einen maßgeblichen Einfluss auf das Minimum an Wasser, das eine Pflanze an ihre Umgebung verliert (Schuster et al. 2016). Da eine Barriere gegen Wasserverlust gleichzeitig die Diffusion von CO₂ aus der Atmosphäre in photosynthetisch aktives Gewebe verhindert, nehmen Pflanzen das notwendige CO₂ über Spaltöffnungen auf. Tatsächlich geht ein Großteil des Wassers, das Pflanzen an ihre Umgebung verlieren, auf die stomatäre Transpiration zurück (Riederer und Schreiber 2001; Hasanuzzaman et al. 2017). Daher ist eine strenge und effiziente Kontrolle des Spaltöffnungsapparates, besonders unter Trockenstressbedingungen, entscheidend für das Überleben und die Entwicklung der Pflanzen.

1.3 Die Rolle der Stomata

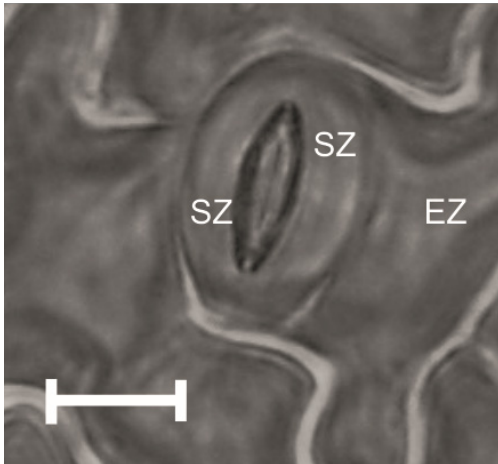


Abbildung 1-1: Lichtmikroskopische Aufnahme einer Spaltöffnung von *Arabidopsis thaliana*

Ein Paar Schließzellen (SZ) umgibt die stomatäre Pore und ist umgeben von Epidermiszellen (EZ). Messbalken entspricht 10µM.

Die Spaltöffnungen (Stomata) von Pflanzen werden durch ein Paar sogenannter Schließzellen (SZ) gebildet, die den stomatären Spalt umgeben (Abbildung 1-1). Neben nierenförmigen SZs (Abbildung 1-1), wie sie die meisten eudikotylen Pflanzen (bspw. *A. thaliana*) aufweisen, haben sich weitere Stomatypen entwickelt. Die Stomata monokotyler Pflanzen sind häufig hantelförmig und weisen zusätzlich zu dem SZ-Paar auch Nebenzellen auf (Tomlinson 1974; Rudall et al. 2017). Durch die Kontrolle der Größe des stomatären Spalts können Pflanzen die Transpiration und die CO₂-Aufnahme den externen Bedingungen anpassen. Dabei wird die Weite des stomatären Spalts durch Turgoränderungen der Schließzellen gesteuert (Roelfsema und Hedrich

2005). Diese weisen asymmetrisch verdickte Zellwände auf (Raschke 1975), welche zusammen mit dem Zytoskelett die Form dieser Zellen vorgeben. Nimmt der Turgor in den Schließzellen ab, fallen diese zusammen und schließen den Spalt, was die stomatäre Transpiration senkt. Steigt dagegen der Turgor, schwellen die Zellen an, wobei die Zellwände und das Zytoskelett nur eine longitudinale Ausdehnung erlauben, wodurch sich die Pore öffnet und CO₂ aufgenommen werden kann. Generell sind Stomabewegungen durch Turgoränderungen der SZs das Ergebnis einer Aufnahme bzw. Abgabe von osmotisch wirksamen Teilchen, vor allem von Kalium und den Anionen Chlorid, Nitrat und Malat (Roelfsema und Hedrich 2005). Aufgrund der Ladung dieser Ionen können sie die Plasmamembran der Schließzellen nur über für sie durchlässige Transportproteine passieren. Um den stomatären Gasaustausch und damit die Transpiration zu kontrollieren, wird die Aktivität dieser Transportproteine streng reguliert. Alle Schließzellbewegungen werden durch vielfältige, externe sowie interne Stimuli induziert (Willmer und Fricker 1996) wobei sich die zugrundeliegenden Signalwege teilweise überschneiden.

1.3.1 Stomaöffnung

Zu den Signalen, die zur Öffnung der Stomata führen, gehören vor allem niedrige CO₂-Konzentrationen und Licht. Sowohl blaues als auch rotes Licht können die Stomaöffnung induzieren. Allerdings sind die Mechanismen und Signalwege verschieden (Shimazaki et al. 2007). Blaues Licht wird über Blaulicht-Photorezeptor-Proteinkinasen (Phototropine, PHOT) perzipiert, was zur Autophosphorylierung und somit zu deren Aktivierung führt. Über eine Kaskade weiterer Kinasen, wie BLUS1 (*Blue Light Signaling1*) (Takemiya et al. 2013) und Phosphatasen, werden schließlich plasmamembranständige H⁺-ATPasen aktiviert, wodurch es zu einem Protonenausstrom und somit zur Hyperpolarisation der Plasmamembran der Schließzellen kommt (Marten et al. 2010; Inoue und Kinoshita 2017). Insgesamt gibt es elf solcher Plasmamembran H⁺-ATPasen in Arabidopsis (AHA1-AHA11), wovon hauptsächlich AHA1 und AHA2 in SZ exprimiert werden (Haruta et al. 2010). Durch die Hyperpolarisierung der Plasmamembran werden spannungsabhängige, einwärtsgerichtete Kaliumkanäle geöffnet und es kommt zu einem Einstrom von K⁺. In Arabidopsis sind fünf solcher Kanäle bekannt (KAT1 und KAT2, AKT1, AKT2/3 und KC1) und es wird davon ausgegangen, dass diese funktionelle homo- oder heteromere Komplexe bilden (Dreyer et al. 1997; Szyroki et al. 2001; Lebaudy et al. 2008). Zusammen mit K⁺ nimmt die Konzentration an Gegenionen wie Cl⁻ und Malat in den Schließzellen zu (Raschke und Schnabl 1978).

Die Mechanismen der Reaktion von Schließzellen auf Rotlicht sind umstritten und kaum bekannt (Mott 2009) und die Schließzell-Reaktion auf Rotlicht scheint verglichen mit der Reaktion auf Blaulicht indirekt induziert zu sein (Roelfsema et al. 2002; Shimazaki et al. 2007). Im Gegensatz zu Blaulicht führte Rotlicht allein zu keiner Hyperpolarisation der Plasmamembran von *Vicia faba* Schließzellen (Roelfsema et al. 2001). Da die Reaktionen auf Rotlicht in fast allen Studien deutlich stärker für intakte Blätter als für isolierte Epidermen ausfielen, wird die Rolle des Mesophylls an der Rotlichtantwort von Schließzellen diskutiert (Roelfsema et al. 2002; Mott 2009). Demnach kommt es durch die Belichtung des Blattgewebes mit Rotlicht aufgrund der photosynthetischen CO₂-Fixierung im Mesophyll zu einer Reduktion der interzellulären CO₂-Konzentration, welche wiederum von Schließzellen bzw. dem umliegenden Mesophyllgewebe erkannt wird. Über einen bis heute unbekanntem Signaltransduktionsweg kommt es bei niedrigen interzellulären CO₂-Konzentrationen schließlich zum Einstrom osmotisch aktiver Teilchen in die SZs, was zur Öffnung der stomatären Pore führt (Roelfsema et al. 2001; Shimazaki et al. 2007; Mott 2009).

1.3.2 Stomaschluss

Auch der Stomaschluss wird durch verschiedene interne und externe Signale induziert. Bei niedriger Luftfeuchte, sowie erhöhten atmosphärischen CO₂-Konzentrationen und Dunkelheit schließen die meisten Pflanzen ihre Spaltöffnungen, um unnötigen Wasserverlust zu vermeiden (Willmer und Fricker 1996; Merilo et al. 2014). Ähnlich wie für die der Stomaöffnung zugrundeliegenden Mechanismen und Signalkaskaden sind auch die Signalwege und Netzwerke, die zum Stomaschluss führen, teilweise bekannt. Dabei spielt das Pflanzenhormon Abszissinsäure (englisch: **abscisic acid**, kurz ABA) eine Schlüsselrolle beim Stress-induzierten Stomaschluss und die an der SZ-Antwort auf ABA beteiligten Signalkaskaden sind aktueller Gegenstand der Forschung.

1.3.3 Die Rolle von ABA beim Stomaschluss

Das Pflanzenhormon ABA ist auch als Trockenstresshormon bekannt und kommt im Pflanzenreich ubiquitär vor (Finkelstein 2013). Es wird hauptsächlich im Leitgewebe (Finkelstein 2013), aber auch direkt in SZ (Bauer et al. 2013) gebildet und ist neben der Adaption an Trockenstress an vielen weiteren Prozessen in Pflanzen beteiligt (Finkelstein 2013).

Pflanzen bilden ABA auf zwei unterschiedlichen Synthesewegen. ABA kann in Plastiden *de novo* aus Karotinoiden gebildet werden. Diese Umwandlung von Xanthophyllen in Xanthoxin durch das Enzym NCED, einer 9-cis-Epoxycarotenoid-Dioxygenase, ist dabei der geschwindigkeitsbestimmende Schritt (Tan et al. 2003). Im Zytosol wird das Xanthoxin in weiteren Oxidationsreaktionen in ABA umgewandelt. Außerdem kann ABA aus einer in Vakuolen und dem Apoplasten gespeicherten inaktiven Form, dem ABA Glukose-Ester (Zeevaart und Boyer 1984; Finkelstein 2013), durch β -Glukosidasen resynthetisiert werden (Lee et al. 2006). *Ataba-3* Mutanten, die aufgrund der fehlenden *de novo* Synthese von ABA einen deutlichen Welke-Phänotyp aufweisen, zeigten eine erhöhte Expression der β -Glukosidase AtBG1, was auf eine (wenn auch nicht ausreichende) kompensatorische Funktion dieses Synthesewegs zur ABA *de novo* Synthese hindeutet (Bauer et al. 2013). Durch die reversible Inaktivierung von ABA durch Konjugation mit einem Glukose-Ester zusammen mit der Schließzellautonomen *de novo* Synthese ist der ABA-Gehalt der Zellen schnell regulierbar, wodurch eine unmittelbare Reaktion auf Umweltreize sichergestellt werden kann (Bauer et al. 2013; Munemasa et al. 2015).

Einige wesentliche Komponenten des ABA-Signalwegs in Schließzellen sind heute bekannt. Kommt es zu einem Anstieg des ABA-Gehalts der Schließzellen, bindet dieses an ABA-Rezeptoren der PYR/PYL-Familie (siehe 1.3.4.1), die wiederum einen Komplex mit

Phosphatasen der Serotonin/Threonin-Proteinphosphatasen der PP2C-Familie bilden, wodurch diese inhibiert werden (Ma et al. 2009; Park et al. 2009). Das Arabidopsis Genom kodiert 79 dieser PP2C-Phosphatasen welche aufgrund von Sequenzhomologien in zehn Untergruppen (A-J) eingeteilt werden können. Mindestens sechs der neun zur Gruppe A gehörenden PP2Cs (ABI1, ABI2, HAB1 and HAB2, AHG1 und PP2CA/AHG3) sind negativ Regulatoren im ABA-Signalweg von Schließzellen (Schweighofer et al. 2004). Arabidopsis *abi1/abi2/hab1* dreifach-Verlustmutanten haben einen stark ausgeprägten ABA-hypersensitiven Stoma-Phänotyp (Rubio et al. 2009b). In Abwesenheit von ABA dephosphorylieren die PP2CAs ihrerseits Kinasen der SnRK-Familie, wodurch diese inhibiert werden. In Arabidopsis wurde die SnRK2-e Kinase **Open Stoma 1** (AtOST1) durch den ABA-insensitiven Stoma-Phänotyp der *atost1*-Mutanten identifiziert (Yoshida et al. 2002; Mustilli et al. 2002) und die physikalische Interaktion von OST1 und ABI1 wurde wenig später nachgewiesen (Yoshida et al. 2006).

Die Komplexbildung der PP2CA-Phosphatasen mit den ABA-Rezeptoren der PYR/PYL-Familie in Anwesenheit von ABA führt wiederum zur Abnahme dieser Interaktion (Ma et al. 2009; Park et al. 2009) und somit zu der Abnahme der Dephosphorylierung von OST1 durch die PP2Cs (Geiger et al. 2009; Vlad et al. 2009). Durch die Autophosphorylierungsaktivität der Kinasen werden diese schließlich aktiviert und können ihrerseits Transportproteine aktivieren, die für die Abgabe von Ionen aus den SZ und damit für den Stomaschluss notwendig sind. Die Aktivierung der SnRK-Kinasen führt zunächst zu einer Aktivierung von langsam deaktivierenden (englisch: *slow deactivating*, kurz S-typ) Anionenkanälen vom SLAC1-Typ (englisch: *slow anion channel-associated 1*) (Negi et al. 2008; Vahisalu et al. 2008). 2009 konnte durch eine Studie in *Xenopus* Eizellen die Aktivierung von AtSLAC1 durch AtOST1 nachgewiesen werden, was zu einem Ausstrom von Cl⁻ aber auch NO₃⁻ führte (Geiger et al. 2009). Auch der S-typ Anionenkanal AtSLAH3 wird in Arabidopsis Schließzellen exprimiert. Dieser weist im Vergleich zu AtSLAC1 aber eine erhöhte Leitfähigkeit für NO₃⁻ auf und im Gegensatz zu AtSLAC1 kann AtSLAH3 nicht durch AtOST1 aber durch NO₃⁻ selbst aktiviert werden (Geiger et al. 2011). Zusätzlich wurde eine Aktivierung beider Kanäle über kalziumabhängige Proteinkinasen (CPKs) nachgewiesen (Geiger et al. 2010; Geiger et al. 2011). Neben den SLAC/SLAHs vermitteln auch Mitglieder der ALMT-Familie (**AL**uminium-aktivierte **Malat T**ransporter) einen Ausstrom von Anionen aus Schließzellen. Der in Arabidopsis Schließzellen exprimierte AtALMT12/QUAC1 ist neben Nitrat und Malat auch durchlässig für Sulfat und kann wie AtSLAC1 ABA-abhängig durch OST1 aktiviert werden (Imes et al. 2013). Darüber hinaus konnte für QUAC1 eine Aktivierung durch Sulfat selbst nachgewiesen werden (Malcheska et al. 2017). Schlussendlich führt der Ausstrom der Anionen zur Depolarisierung der Plasmamembran von Schließzellen, was zur Öffnung von

spannungsabhängigen Kaliumkanälen (GORK, *guard cell outward rectifier (K)potassium*) führt und somit in einem immensen Ausstrom von K^+ resultiert (Ache et al. 2000). Wasser strömt entsprechend dem Wasserpotenzialgefälle nach und durch den geringeren Turgor der Schließzellen fallen diese zusammen und der stomatäre Spalt schließt sich.

1.3.4 Die Spezifität des ABA-Signalwegs

Die Synthese von ABA wird durch verschiedene Umweltreize induziert. So führt Trockenstress, Salzstress und zu einem gewissen Grad auch Kälte zu einer adaptiven Erhöhung des ABA-Gehalts in pflanzlichen Zellen (Xiong und Zhu 2003). Dabei nimmt der ABA-Gehalt in SZs nicht nur durch den über die Wurzeln perzipierten und vermittelten Trockenstress zu. Auch einzelne, von den Wurzeln getrennte Blätter sind in der Lage auf eine Abnahme der Luftfeuchtigkeit mit der Schließung der Stomata zu reagieren. An Arabidopsis konnte gezeigt werden, dass für diesen, durch die Absenkung der Luftfeuchtigkeit induzierten Stomaschluss in Schließzellen autonom ABA synthetisiert wird und dass Verlustmutanten einzelner ABA-Synthesegene insensitiv gegenüber einer Erniedrigung der relativen Luftfeuchte sind (Bauer et al. 2013).

Auch der Signalweg, der dem CO_2 -induzierten Stomaschluss zugrunde liegt, überlappt zumindest teilweise mit dem ABA-Signalweg. So konnte für viele der am ABA-Signalweg beteiligten Komponenten ebenfalls eine Funktion im CO_2 -Signalweg gezeigt werden (Chater et al. 2015; Engineer et al. 2016; Hedrich und Geiger 2017). Beispielsweise reagieren *Atost1*-Mutanten weder auf ABA (Mustilli et al. 2002), noch auf eine Erhöhung des atmosphärischen CO_2 -Gehaltes mit einem Wildtyp-ähnlichen Stomaschluss (Xue et al. 2011; Merilo et al. 2014). Auch die Stomata von *Atslac1*-Mutanten weisen neben dem ABA-insensitiven Stoma-Phänotyp eine CO_2 -Insensitivität auf (Negi et al. 2008; Vahisalu et al. 2008). Neuere Studien an transgenen Arabidopsis-Pflanzen deuten sogar an, dass die Aktivierung von SLAC1 durch erhöhtes CO_2 auch über einen ABA-unabhängigen Weg stattfindet (Yamamoto et al. 2016). Bis heute ist es umstritten, ob erhöhtes CO_2 zu einer sehr schnellen Erhöhung des ABA-Gehalts in Schließzellen führt oder ob ABA das CO_2 -Signal aufgrund des teilweise konvergenten Signalweges lediglich verstärkt (Engineer et al. 2016; Hedrich und Geiger 2017; Hsu et al. 2018). Auch die Frage nach der Identität eines CO_2 -Sensors in Pflanzenzellen bleibt bis heute offen. Studien an verschiedenen Kinase-Mutanten wie *Atht1*-Mutanten (englisch: *heat tolerant 1*) sowie Carboanhydrase-Mutanten deuten auf deren Rolle beim CO_2 -induzierten Stomaschluss hin: *Atht1*-Mutanten weisen einen CO_2 -insensitiven Stoma-Phänotyp auf, während der Stomaschluss durch exogenes ABA unbeeinflusst bleibt (Hashimoto et al. 2006). Auch Arabidopsis Doppelmutanten der Carboanhydrasen $\beta CA1$ und $\beta CA4$, welche die Umwandlung von CO_2 und H_2O in HCO_3^- und H^+ reversibel katalysieren, haben einen CO_2 -insensitiven Phänotyp, reagieren aber auf ABA (Hu et al. 2010). Allerdings

konnte im Gegenzug für die Stomata von Arabidopsis ABA-Rezeptormutanten neben einer verminderten Sensitivität gegenüber ABA auch eine verminderte Sensitivität gegenüber erhöhtem CO₂ nachgewiesen werden, was auf eine zentrale Rolle von ABA im CO₂-Signalweg in Schließzellen hindeutet (Merilo et al. 2013; Chater et al. 2015).

Obwohl die Signaltransduktion in Schließzellen für verschiedene Reize zumindest anteilig durch den ABA-Signalweg vermittelt zu werden scheint, sind einzelne Komponenten der Antworten für jeden Reiz spezifisch. In einer Microarray-Studie an Arabidopsis wurde gezeigt, dass sich die Auswirkungen von ABA und reduzierter Luftfeuchte auf genexpressioneller Ebene unterscheiden, obwohl die schnelle Stomareaktion auf eine Absenkung der Luftfeuchte selbst ABA-abhängig ist (Bauer et al. 2013). Bis heute ist wenig darüber bekannt, wie die Spezifität der ABA-vermittelten Signale in Schließzellen (aber auch in anderen Geweben) erreicht wird, allerdings wird die Rolle verschiedener Komponenten des ABA-Signalwegs an der Spezifität der Signale seit längerem diskutiert. So gelten beispielsweise einige Mitglieder der sogenannten MAPK-Kaskaden (englisch: *mitogen activated protein kinase*) als wichtiges Stellglied in der Spezifität des ABA-Signals in Schließzellen (Lee et al. 2016). Aufgrund der hohen Anzahl an in Schließzellen vorkommenden MAP-Kinasen sowie der ABA-Abhängigkeit dieser MAPK-Kaskaden wird deren Redundanz im Schließzell-Signalweg untersucht (Danquah et al. 2015). Interessanterweise codiert das Arabidopsis Genom auch eine große Anzahl von ABA-Rezeptoren der PYR/PYL-Familie. Ob diese Rezeptoren eine funktionelle Diversität *in planta* aufweisen und dadurch ebenfalls zur Spezifikation der ABA-Signaltransduktion in Schließzellen beitragen, ist Gegenstand aktueller Forschung und sollte im Rahmen dieser Arbeit weiter untersucht werden. Das Wissen über die spezifischen Eigenschaften einzelner ABA-Rezeptoren kann in züchterischen und gentechnischen Ansätzen genutzt werden, um tolerantere Nutzpflanzen hervor zu bringen (Sah et al. 2016).

1.3.4.1 ABA-Rezeptoren der PYR/PYL-Familie

Über die Identität von ABA-Rezeptoren in Pflanzen wurde lange spekuliert. Als vielsprechende Kandidaten wurden sowohl G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) aber auch eine Untereinheit einer Mg-Chelatase diskutiert (Shen et al. 2006; Pandey et al. 2009). Diese sind aber aufgrund schwach ausgeprägter ABA-Phänotypen und einer mit Wildtyp-Pflanzen vergleichbaren ABA-Sensitivität entsprechender Verlust-Mutanten umstritten.

2009 gelang es zwei Arbeitsgruppen nahezu zeitgleich eine Gruppe von Proteinen der START-Familie (englisch: *steroidogenic acute regulatory-related lipid transfer*) als zytosolische ABA-Rezeptoren in Arabidopsis zu identifizieren (Ma et al. 2009; Park et al. 2009). Aufgrund der Inhibierung einiger dieser Proteine durch Pyrabaktin, einem ABA-Analogen, wurden diese Proteine **Pyrabaktin Resistance 1** (PYR1) bzw. *PYR-like* (PYL) genannt (Park et al. 2009). Seit

ihrer Entdeckung wird intensiv an der Struktur und der Funktion dieser Rezeptoren geforscht. PYR/PYL-Rezeptoren kommen ubiquitär in allen Landpflanzen vor und haben sich demnach sehr früh in der Evolution der Pflanzen entwickelt (Hauser et al. 2011). Die 14 in Arabidopsis vorkommenden PYR/PYL-Proteine sind zwischen 150 und 200 Aminosäuren lang und können basierend auf ihrer Sequenzhomologie in drei Untergruppen eingeteilt werden. Unterfamilie I beinhaltet PYL7-PYL10, Unterfamilie II PYL4-6 und PYL11-13 und Gruppe III PYR1 und PYL1-3 (Raghavendra et al. 2010). Alle Mitglieder der PYR/PYLS haben eine, von vier hochkonservierten Schleifen (englisch: *loop*) (CL1-CL4) umgebene ABA-bindende Tasche. Bindet ABA, kommt es zu einer Konformationsänderung des so genannten *switch loops* (CL2), wodurch die Interaktion mit PP2Cs möglich wird (Melcher et al. 2009; Yin et al. 2009).

Trotz der großen Homologie haben die ABA-Rezeptoren spezifische Eigenschaften. So liegen AtPYR1 und AtPYL1-2 als Homodimere im Zytosol vor, während PYL3-PYL10 dort als lösliche Monomere vorkommen (Hao et al. 2011). Darüber hinaus konnte beispielsweise für PYR1 und PYL5 zusätzlich die Lokalisation im Zellkern nachgewiesen werden (Santiago et al. 2009; Park und Kim 2017). Außerdem zeigen Interaktionsstudien, dass die Rezeptoren sich in ihrer Affinität gegenüber ABA sowie der Interaktion mit verschiedenen PP2C-A Phosphatasen unterscheiden. So konnte beispielsweise in einem *in vitro* Aktivitäts-Assay gezeigt werden, dass zwar alle untersuchten PYR/PYLS einen negativen, ABA-abhängigen Effekt auf die Phosphatase-Aktivität von PP2CA hatten, sie sich aber in der Effektivität unterschieden (Antoni et al. 2012). Eine andere Studie fand eine höhere ABA-Sensitivität für die Inaktivierung von ABI1 durch PYL8 ($IC_{50} \sim 18 \text{ nM}$) als für PYL9 ($IC_{50} \sim 35 \text{ nM}$) (Szostkiewicz et al. 2010). In einem *yeast two hybrid screen* wurde für AtPYL13 eine ABA-unabhängige physikalische Interaktion mit sechs PP2C-As nachgewiesen. Allerdings konnte diese ABA-unabhängige Interaktion nur die Phosphatase-Aktivität von PP2CA, HAI2 und HAI3 in Arabidopsis-Protoplasten inhibieren, worauf die Induktion eines ABA-Reportergens (RD26-LUC) hindeutete (Zhao et al. 2013). Darüber hinaus scheint PYL13 in der Lage zu sein, physikalisch mit anderen PYR/PYL-Rezeptoren Heterodimere zu bilden, was wiederum der ABA-Antwort dieser Rezeptoren entgegen zu wirken scheint, indem es die Bindungsaffinität dieser Rezeptoren gegenüber ABA herabsetzt (Zhao et al. 2013).

Studien an Reis und Sojabohnen deuten auch auf spezifische Eigenschaften der einzelnen PYR/PYL-Rezeptoren hin. Für die 23 in Sojabohnen vorkommenden PYR/PYL-Rezeptoren konnte gezeigt werden, dass sie sich in ihrer Affinität gegenüber ABA unterscheiden und einige auch in Abwesenheit von ABA mit verschiedenen PP2Cs *in vitro* interagieren (Bai et al. 2013). Unter den zwölf in Reis gefundenen PYR/PYL-Orthologen (OsPYL1-13) befinden sich ähnlich wie in Arabidopsis sowohl monomer als auch dimer vorkommende Rezeptoren, welche

ebenfalls ABA-abhängig aber auch ABA-unabhängig die Phosphatase-Aktivität einzelner PP2Cs inhibieren (He et al. 2014). Dabei scheint OsPYL12 ähnlich wie AtPYL13 besondere Eigenschaften zu haben. In einem *in vitro* Phosphatase-Assay war OsPYL12, als einziger der Reis ABA-Rezeptoren, in der Lage die Phosphatase-Aktivität von OsPP2C06 und OsPP2C09 auch in Abwesenheit von ABA vollständig zu inhibieren (He et al. 2014).

Über die physiologischen Funktionen einzelner PYR/PYL-Rezeptoren *in planta* ist bis heute allerdings wenig bekannt. Zwar zeigten Studien an überexprimierenden Arabidopsis-Rezeptormutanten, dass die Überexpression einzelner ABA-Rezeptoren in der gesamten Pflanze oder einzelnen Geweben zu einer gesteigerten Trockentoleranz, einer hypersensitiven ABA-Antwort in der Keimung und dem Wurzelwachstum sowie frühzeitiger Blattseneszenz bei Trockenstress führt (Santiago et al. 2009; Pizzio et al. 2013; Zhao et al. 2016), allerdings kann die native Funktion der einzelnen Rezeptoren sowie eine funktionelle Divergenz so nicht entschlüsselt werden. In überexprimierenden Pflanzen unterscheidet sich zum einen die Rezeptormenge von der der Wildtyp-Pflanzen, zum anderen vernachlässigen solche Studien häufig die Gewebespezifität der einzelnen Rezeptoren.

Expressionsanalysen zeigen, dass in verschiedenen Geweben unterschiedliche PYR/PYL-Rezeptoren exprimiert werden. In Arabidopsis Schließzellen werden hauptsächlich sechs (PYR1, PYL1, PYL2, PYL4, PYL5 und PYL8) der 14 Rezeptoren exprimiert, während PYL11-13 in keinem der untersuchten Gewebe eine starke Expression zeigten (Gonzalez-Guzman et al. 2012). Neben Schließzellen werden die PYR/PYLS vor allem im Leitgewebe und in Wurzeln exprimiert (Park et al. 2009; Gonzalez-Guzman et al. 2012). In Arabidopsis-Wurzeln konnten einigen Rezeptoren bereits spezifische Funktionen zugeordnet werden. Während *Atpyl8*-Mutanten einen hypersensitiven Phänotyp gegenüber ABA im lateralen Wurzelwachstum aufwiesen, zeigte eine vierfach Verlustmutante der Rezeptoren *pyr1/pyl1/2/4* keinen ABA-Phänotyp im Wurzelwachstum (Zhao et al. 2014). In dieser Studie wurde zusätzlich gezeigt, dass PYL8 als einziger der untersuchten ABA-Rezeptoren mit dem im Auxin-Signalweg involvierten Transkriptionsfaktor MYB77 interagiert und so möglicherweise den Auxin- mit dem ABA-Signalweg verknüpft. Andere Interaktionsstudien darauf hin, dass auch PYL9 mit verschiedenen Transkriptionsfaktoren der MYB-Familie interagieren kann (Li et al. 2014). Ähnlich wie AtPYL8 scheint auch AtPYL9 an der Steuerung des lateralen Wurzelwachstums *in planta* beteiligt zu sein und über die Interaktion mit MYB-Transkriptionsfaktoren den ABA- mit dem Auxin-Signalweg zu verknüpfen (Xing et al. 2016).

Das gleichzeitige Vorkommen mehrerer ABA-Rezeptoren im selben Gewebe, sowie die differentielle Expression einzelner, legt eine funktionelle Spezifikation der Rezeptoren nahe (Gonzalez-Guzman et al. 2012). So könnte die Spezifität der Signaltransduktion in

Schließzellen auf verschiedene Reize hin über die verschiedenen ABA-Rezeptoren sichergestellt werden. In *Arabidopsis* Schließzellen werden hauptsächlich die als Dimere vorliegenden ABA-Rezeptoren PYR1, PYL1 und PYL2 sowie die monomer vorkommenden Rezeptoren PYL4, PYL5 und PYL8 exprimiert (Gonzalez-Guzman et al. 2012). Bis dato konnte an *Arabidopsis* gezeigt werden, dass die Stomata der sechsfach Rezeptor-Verlustmutante *pyr1pyl1pyl2pyl4pyl5pyl8* (kurz: 112458) vollständig ABA-insensitiv sind und auch die ABA-regulierte Genexpression dieser Mutanten deutlich vom Wildtyp abweicht (Gonzalez-Guzman et al. 2012). In dieser Studie war die stomatäre Leitfähigkeit der 112458 (aber auch verschiedener dreifach und vierfach Rezeptor-Mutanten) schon unter Kontrollbedingungen deutlich erhöht, was die grundlegende Rolle von ABA bei der Regulierung der Stomata andeutet. Zusätzlich wurde gezeigt, dass auch die stomatäre Reaktion auf Dunkelheit, Luftfeuchtigkeit, CO₂ und Ozon in der 112458-Mutante im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen deutlich reduziert war (Merilo et al. 2013), was auf eine zentrale Rolle der Rezeptoren in der Reaktion auf all diese Reize hindeutet. Ob sich die einzelnen Rezeptoren in ihrer Funktion im Schließzell-Signalnetzwerk unterschieden ist aber bis heute völlig ungeklärt.

1.3.5 Zielsetzung I: Die funktionelle Spezifität der ABA-Rezeptoren in Schließzellen von *Arabidopsis thaliana*

Die Beteiligung von Komponenten des ABA-Signalwegs an der Vermittlung individueller Reaktionen in Schließzellen auf verschiedene Reize hin, wirft die Frage auf, wie die Spezifität der einzelnen Signalkaskaden sichergestellt wird. Das gleichzeitige Vorkommen verschiedener ABA-Rezeptoren in Schließzellen sowie die bereits nachgewiesenen, spezifischen Eigenschaften einzelner PYR/PYL-Rezeptoren deuten auf eine funktionelle Divergenz der ABA-Rezeptoren hin.

Neben der bereits *in vitro* nachgewiesenen, unterschiedlichen Affinität der Rezeptoren gegenüber ABA, könnte die Spezifität der Signaltransduktion zusätzlich auf expressioneller Ebene reguliert werden, indem geringe Änderungen der ABA-Konzentration Auswirkungen auf die Zusammensetzung des Rezeptor-Pools von Schließzellen haben. Mittels Expressionsstudien in *Arabidopsis thaliana* Wildtyp-Pflanzen sollte überprüft werden, ob Änderungen der ABA-Konzentration einen Einfluss auf die Expression der Rezeptoren haben und ob die Expression der verschiedenen Rezeptoren unterschiedlich sensitiv gegenüber ABA ist. Außerdem sollten im Rahmen dieser Arbeit Einblicke in die Funktion einzelner PYR/PYL-Rezeptoren an der Signaltransduktion von Schließzellen auf verschiedene Reize hin gewonnen werden. Mit Hilfe von fünffach Verlust-Mutanten der in Schließzellen exprimierten ABA-Rezeptoren sowie Komplementationslinien einzelner Rezeptoren in diesen Verlust-Mutanten sollte die Rolle der verschiedenen Rezeptoren im SZ-Signalweg aufgedeckt werden.

Um funktionelle Unterschiede der Rezeptoren *in planta* zu verstehen, wurden insbesondere die Stomareaktionen auf Änderungen des ABA-Gehalts und der atmosphärischen CO₂-Konzentrationen der verschiedenen Mutanten mittels Blattgaswechsellmessungen untersucht. Da alle Stomaschluss-Stimuli, vor allem auf expressioneller Ebene, individuelle Anpassungen in Schließzellen hervorrufen, wurde untersucht, ob einzelne ABA-regulierte Gene unter der Kontrolle bestimmter ABA-Rezeptoren stehen oder ob die Rezeptoren hierbei redundant agieren.

1.4 Spezialisten an extremen Standorten: Stomatäre Anpassungen von *Phoenix dactylifera*

Während über das Verhalten der Stomata von Modellpflanzen wie *Arabidopsis* auf verschiedene Reize hin heute sehr viel bekannt ist und die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen dieser Schließzellreaktionen teilweise verstanden sind, ist über die Physiologie der Schließzellen von stresstoleranten Arten nur wenig bekannt. Dieses Wissen über grundlegende Mechanismen in sensitiven Modellpflanzen sowie die zunehmende Verfügbarkeit von Genom- und Transkriptominformationen auch von toleranten Arten erlaubt einen direkten Vergleich der Schließzellphysiologie toleranter und sensitiver Arten und ermöglicht damit, adaptive Unterschiede zu identifizieren, die es einigen Arten erlauben an extremen Standorten zu existieren. Im Rahmen dieser Arbeit sollten daher Einblicke in die Stomaphysiologie von Dattelpalmen gewonnen werden.

Dattelpalmen (*Phoenix dactylifera*) sind besonders an heiße, trockene und salzige Standorte angepasste Nutzpflanzen. Der Hauptgrund für den Anbau von Dattelpalmen sind die süßen, nahrhaften Früchte. Sie werden seit mehreren Tausend Jahren vor allem auf der Arabischen Halbinsel, in Nord Afrika und dem Mittleren Osten als Nutzpflanzen angebaut und sind dort, mit einer globalen Produktion von ca. 5,5 Millionen Tonnen pro Jahr (stand 2001) von großer ökonomischer Bedeutung (Botes und Zaid 2002; Chao und Krueger 2007). Dattelpalmen sind mehrjährige, monokotyle C₃-Pflanzen, die der Familie der *Palmaceae* zugeordnet werden (Zaid und de Wet 2002). Über die Stoma-Physiologie der Dattelpalme ist bis heute sehr wenig bekannt. Generell gelten Stomata von monokotylen Pflanzen als reaktionsschneller auf externe Stimuli als die Stomata dikotyler Pflanzen, was als Adaption an trockene Standorte diskutiert wird (Chen et al. 2017). Für die monokotylen Nutzpflanzen Gerste und Weizen konnte beispielsweise gezeigt werden, dass diese im Vergleich zu *A. thaliana* oder *Helianthemum nummularium* schneller auf atmosphärische CO₂-Änderungen und Beleuchtung reagieren (Merilo et al. 2014; Kollist et al. 2014). Stomata monokotyler Pflanzen weisen häufig so genannte Nebenzellen (kurz NZ) auf. Die Nebenzellen sind spezialisierte

Epidermiszellen, die direkt an die Schließzellen angrenzen. Sie werden als Ursache für das schnellere Reaktionsvermögen der Stomata monokotyler Pflanzen diskutiert (Chen et al. 2017) und bereits 1971 zeigten Raschke und Fellows an Maispflanzen, dass während Stomabewegungen ein Transport von Chlorid- und Kalium-Ionen zwischen SZs und NZs stattfindet. Dennoch weiß man über die stomatären Eigenschaften, die es Pflanzen wie den Dattelpalmen erlauben an solch lebensfeindlichen Standorten zu existieren, bis dato sehr wenig und die meisten Veröffentlichungen über die Mechanismen der Stresstoleranz von *P. dactylifera* beziehen sich auf Keimlinge oder Kalli (Al-Khayri und Al-Bahrany 2004; Djibril et al. 2005; El Rabey et al. 2015). Diese Studien konnten unter anderem zeigen, dass Trockenstress zu einer Erhöhung des Prolingehalts im Kallusgewebe von Dattelpalmen führt, um das osmotische Potential abzusenken (Al-Khayri und Al-Bahrany 2004). Auch die Änderung der Proteinzusammensetzung durch Trockenstress in Blättern von Dattelpalmen-Keimlingen wurde nachgewiesen. Hierbei handelte es sich hauptsächlich um Photosynthese-assoziierte Proteine, wie die beiden Untereinheiten der RUBISCO (Ribulose,1-5-Bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase) und verschiedene Komponenten der Lichtsammelkomplexe I und II (englisch: *light harvesting complex*, LHC)(El Rabey et al. 2015). Diese Reaktionen auf abiotischen Stress sind auch von weniger toleranten Arten wie Arabidopsis bekannt und auf den ersten Blick nicht außergewöhnlich (Hare und Cress 1997; Galmes et al. 2013).

Auffallend sind allerdings die Ergebnisse einer Studie über die Auswirkungen von Trockenheit und Hitze auf die Stoma-Physiologie adulter Dattelpalmen (Arab et al. 2016). Während sensitive Arten auf Trockenheit mit einer Verringerung der stomatären Leitfähigkeit reagieren um Wasserverlust zu vermeiden (Flexas et al. 2004), änderte sich die stomatäre Leitfähigkeit der untersuchten Dattelpalmen durch Trockenstress nicht (Arab et al. 2016). Gleichzeitig konnte auf transkriptioneller Ebene die differentielle Expression ABA-regulierter Gene durch Trockenstress nachgewiesen werden (Safronov et al. 2017), was auf einen Anstieg des ABA-Gehalts in Dattelpalmen bei Trockenheit hindeutet. An Dattel-Keimlingen konnte ein Effekt von ABA, welches als endogenes Entwicklungssignal erkannt wird, auf das laterale Wurzelwachstum nachgewiesen werden (Hassan et al. 2008) und so eine Perzeption des ABAs nahelegt. Ob ein Anstieg des ABA-Gehalts in Schließzellen von Dattelpalmen aber auch zum Stomaschluss führt, ist noch unbekannt. Bislang wurde nicht untersucht, ob die Stomata der Wüstenpflanze *P. dactylifera* Besonderheiten in ihrer Morphologie oder Physiologie aufweisen, mit denen sie sich an die trockenen und heißen Bedingungen in ihrem natürlichen Habitat angepasst haben und entsprechende Untersuchungen sind daher auch Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

1.4.1 Zielsetzung II: Charakterisierung der Stomaphysiologie von *Phoenix dactylifera*

Während die Stomaphysiologie der Modellpflanze Arabidopsis gut untersucht ist und die Reaktionen auf diverse externe und interne Stimuli bekannt sind, sind die Reaktionen anderer extremophiler Pflanzen wenig untersucht. Über die Reaktion der Stomata von Dattelpalmen auf externe Reize wie die Lichtintensität oder die Reaktion auf interne Reize wie ABA ist sehr wenig bekannt. Aus diesem Grund sollte im Rahmen dieser Arbeit die Stomaphysiologie von Dattelpalmen untersucht werden. Da es sich bei Dattelpalmen um besonders gut an trockene, heiße Standorte mit hohen Lichtintensitäten angepasste Pflanzen handelt, wurde besonderes Augenmerk auf den ABA-induzierten Stomaschluss, sowie die Stomaöffnung bei hohen Lichtintensitäten gelegt. Hierfür wurden mittels Infrarotgasanalyse die Änderungen der Transpirationsraten von einzelnen Fiederblättern von *Phoenix dactylifera* durch ABA und Licht vergleichend mit *A. thaliana* untersucht, um so Unterschiede in der Stomaphysiologie zu identifizieren, die es Dattelpalmen erlauben, an ihren natürlichen Standorten zu existieren.

1.5 Anpassungen an Ionentoxizität bei Salzstress

Neben besonders trockenen und heißen Standorten konnten sich einige Pflanzenarten auch an salzige Standorte anpassen. Als salztolerante Pflanzen (Halophyten) gelten alle Pflanzen, die im Gegensatz zu sensitiven Arten (Glykophyten) ihren Entwicklungszyklus bei Salzbedingungen vollenden können (Parida und Das 2005; Munns und Tester 2008). Salzstress wird in der Literatur häufig als Synonym für durch NaCl verursachten Stress verwendet und auch in der hier vorliegenden Arbeit wird der Begriff Salzstress immer als Synonym für hohe NaCl-Konzentrationen benutzt. Hohe NaCl-Konzentrationen im Boden können, neben dem negativen Effekt auf den Wasserhaushalt (osmotischer Stress, siehe 1.1), durch die Aufnahme von Na⁺- und Cl⁻-Ionen auch zu sogenanntem ionischem Stress führen (Munns und Tester 2008). Besonders längeres Wachstum auf NaCl-haltigen Böden führt bei den meisten Arten zur Aufnahme von Na⁺ und Cl⁻, was zu ionischem Stress durch Ionentoxizität führen kann. Der Effekt beruht auf einer Störung von verschiedenen Stoffwechselprozessen in den Zellen, die vor allem durch Verdrängung anderer gleichwertiger Ionen aus enzymatischen Reaktionen auftritt. Beispielsweise wird der negative Effekt von Na⁺ auf die Physiologie von pflanzlichen Zellen unter anderem der großen physikalisch-chemischen Ähnlichkeit zu K⁺ zugeschrieben (Maathuis und Amtmann 1999). Chlorid ist ein essentieller Pflanzennährstoff, der an der Regulation vieler Prozesse beteiligt ist und von Pflanzen unter anderem als Osmotikum genutzt wird. Kürzlich konnte an Tabakpflanzen gezeigt werden, dass Chlorid in geringen Konzentrationen einen positiven Einfluss auf die

Blattfläche und die Wassernutzungseffizienz hat (Franco-Navarro et al. 2016). Allerdings ist Chlorid ab einer gewissen Konzentration im Gewebe für Pflanzen auch toxisch. Für *Vitis* und Zitruspflanzen ist bekannt, dass eine zu hohe Chlorid-Konzentration zu einer Verringerung der Photosyntheserate und reduziertem Wachstum führt (Brumos et al. 2010). Da in den meisten Pflanzenarten die Na^+ -Konzentration deutlich vor der Cl^- -Konzentration ein toxisches Niveau erreicht, sind die Ursachen für die Toxizität sowie die zugrunde liegenden Transportprozesse von Cl^- im Vergleich zu Na^+ weniger untersucht (Munns und Tester 2008; Li et al. 2017).

Die Toleranz von Halophyten gegenüber ionischem Stress kann entweder bei so genannten Exkludern auf einem effizienten Ausschluss toxischer Ionen aus dem Gewebe basieren oder bei so genannten Inkludern auf einer im Vergleich zu Glykophyten gesteigerten Toleranz gegenüber hohen Konzentrationen von Na^+ - und Cl^- -Ionen in den Zellen beruhen (Marschner und Marschner 2011; Flowers et al. 2015). Allerdings konnte für verschiedene zytosolisch vorkommende, homologe Enzyme aus der salztoleranten inkludierenden Art *Atriplex spongiosa* und der sensitiven Art *Phaseolus vulgaris* in einem *in vitro* Enzymaktivitäts-Assay eine vergleichbare Inhibierung der Enzymaktivität durch NaCl nachgewiesen werden (Greenway und Osmond 1972). Auf Zellebene scheint die höhere Toleranz gegenüber Natrium- und Chlorid-Ionen bei Inkludern daher vermutlich eher auf einer effizienteren Kompartimentierung der Ionen in die Vakuolen als auf einer erhöhten zytoplasmatischen Toleranz zu basieren (Munns und Tester 2008; Cheeseman 2013; Flowers et al. 2015).

Um überschüssiges Na^+ und Cl^- aus dem Zytoplasma auszuschließen, haben sich verschiedene Mechanismen entwickelt, deren molekulare Grundlage zumindest teilweise in allen höheren Landpflanzen, auch den Glykophyten vorkommt (Flowers et al. 2010). Der Ausschluss der toxischen Ionen aus dem Zytoplasma der photosynthetisch aktiven Blätter erfolgt über eine strikte Regulation der Aufnahme in die Wurzeln, dem Transport der Ionen über das Xylem, und wie bereits erwähnt, der Kompartimentierung der Ionen. Da Ionen aufgrund ihrer Ladung Zellmembranen nur über Transportproteine passieren können, spielen diese Transportproteine bei der Adaption an Salzstress bzw. der Vermeidung von Ionentoxizität eine große Rolle. Die meisten bis dato veröffentlichten molekularbiologischen Studien untersuchten aber hauptsächlich die durch Salzstress induzierten Transportvorgänge in nicht-toleranten Modellpflanzen wie *Arabidopsis* oder nicht-toleranten Nutzpflanzen wie Mais, Reis oder Weizen (Rozema und Schat 2013).

1.5.1 Anionen-Transportsysteme

Die Aufnahme von Chlorid erfolgt über die Wurzeln. Um bei hohen Salzkonzentrationen eine exzessive Aufnahme von Cl^- in den Spross und das Blattgewebe zu vermeiden, ist die Regulation des Transports von Cl^- aus dem Symplasten der Wurzelstele in den Apoplasten des Xylems, elementar (Li et al. 2017). Die Beteiligung verschiedener Anionen-Transportproteine an dieser Xylembeladung wird diskutiert. Neben ALMTs (Henderson et al. 2014) und Mitgliedern der **Nitrat Transporter/Peptid Transporter Familie** (NPFs) (Li et al. 2016) scheinen auch SLAH1 und SLAH3 (englisch: *slow-type Anion Channel Associated Homologs*), beides Vertreter der SLAC-Familie (siehe 1.3.2) an der Xylembeladung mit Chlorid beteiligt zu sein (Qiu et al. 2016; Cubero-Font et al. 2016). Erst kürzlich konnte für Arabidopsis gezeigt werden, dass AtSLAH1 in Perizykelzellen einen Komplex mit AtSLAH3 bildet, diesen aktiviert und zu einer Erhöhung der Chlorid-Leitfähigkeit von AtSLAH3 führt, was letztendlich die Cl^- -Freigabe in das Xylem vermittelt (Cubero-Font et al. 2016). Verlustmutanten beider Untereinheiten hatten eine bis zu 30% niedrigere Cl^- -Konzentration im Xylemsaft (Cubero-Font et al. 2016), wohingegen AtSLAH1 überexprimierende Pflanzen eine deutliche Akkumulation von Cl^- im Xylemsaft im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen aufwiesen (Qiu et al. 2016). Außerdem konnte ein negativer Effekt einer erhöhten Salzkonzentration auf die Expression von AtSLAH1 und AtSLAH3 gezeigt werden (Cubero-Font et al. 2016). Die Überexpression von AtSLAH3 dagegen führte zu einer Erhöhung des $\text{NO}_3^-/\text{Cl}^-$ -Verhältnisses (Qiu et al. 2016), was mit der höheren Leitfähigkeit von AtSLAH3 für NO_3^- über Cl^- übereinstimmt (Geiger et al. 2011). Die Verschiebung des $\text{NO}_3^-/\text{Cl}^-$ -Verhältnisses zu Gunsten von Cl^- in Pflanzen unter Salzstressbedingungen wird als einer der Hauptgründe für die Toxizität von Cl^- für Pflanzen diskutiert (Li et al. 2017), da viele der in Pflanzen vorkommenden Anionenkanäle eigentlich zur Aufnahme von Nitrat dienen und neben der Nitratleitfähigkeit auch für Chlorid permeabel sind (Barbier-Brygoo et al. 2011)

Neben dem Ausschluss von überschüssigem Chlorid aus den oberirdischen Pflanzenteilen ist das Einlagern des Chlorids in die Vakuolen ein weiterer Mechanismus von Pflanzen, die Toleranz gegenüber hohen Chlorid-Konzentrationen zu erhöhen. AtALMT9 ist im Tonoplasten von Schließzellen, Xylemparenchymzellen sowie in Wurzelstelezellen lokalisiert und Arabidopsis *almt9*-Mutanten weisen bei Salzbehandlung eine niedrigere Chlorid-Konzentration im Spross auf (Baetz et al. 2016). Auch einige Vertreter der Familie der CLCs (englisch: *Chloride channel*) scheinen an dem Transport und der Akkumulation von Chlorid in Vakuolen eine Rolle zu spielen. Bei diesen Chlorid-Transportproteinen handelt es sich um Anionen/Protonen-Antiporter, die entweder Chlorid oder Nitrat unter Nutzung des Protonengradienten über den Tonoplasten transportieren. In Arabidopsis sind sieben

Mitglieder dieser Familie bekannt (AtCLC-a bis AtCLC-g), wovon alle in Endomembranen lokalisiert sind (Zifarelli und Pusch 2010). AtCLC-c ist unter anderem an der Cl⁻-Beladung der Vakuolen von Wurzelmesophyllzellen beteiligt (Jossier et al. 2010) und *Atclc-g* Mutanten zeigen einen hypersensitiven Phänotyp gegenüber Salzbehandlung (Nguyen et al. 2016).

1.5.2 Kationen-Transportsysteme

Die Mechanismen zur Vermeidung von Natrium-Toxizität im Gewebe unter Salzstressbedingungen ähneln denen für Chlorid. Aufgrund der geringen Na⁺-Konzentration im Zytoplasma wird Na⁺ aber im Gegensatz zu Cl⁻ jedoch häufig nicht als essentieller Nährstoff, sondern ausschließlich als toxisch angesehen (Kronzucker et al. 2013). Tatsächlich wird Na⁺ aber von einigen C₄-Arten essentiell für die Pyruvataufnahme in Chloroplasten durch den Pyruvat-Na⁺-Co-Transporter BASS2 benötigt (Furumoto et al. 2011). Auch Nutzpflanzen, wie bspw. Spinat oder Zuckerrüben (*Chenopodiaceae*), können von der Verfügbarkeit von Natrium sogar profitieren. Die förderliche, nicht toxische Na⁺-Konzentration liegt allerdings im niedrigen millimolaren Bereich und Natrium gilt daher allenfalls als Mikronährstoff (Subbarao et al. 2003).

Die Fähigkeit, die zytosolische Natriumkonzentration gering zu halten wird als eines der Schlüsselmerkmale salztoleranter Pflanzen angesehen (Munns und Tester 2008). Obwohl die Transportprozesse von Na⁺ in Pflanzen besser untersucht sind als die von Cl⁻ und sich die meisten Studien über die Ursachen und Auswirkungen von NaCl-Stress auf Pflanzen auf den Effekt von Natrium-Ionen fokussieren, ist das Wissen über die zugrundeliegenden Transportvorgänge noch lückenhaft.

Um die Akkumulation in photosynthetisch aktiven Pflanzenteilen zu vermeiden, wird die Aufnahme von Natrium über die Wurzelhaare reguliert. Da Natrium-Ionen eine Ladung tragen, können sie die Membranen der Wurzelhaarzellen nur über Transportproteine passieren. Die ersten Transportproteine, die für die Na⁺-Aufnahme verantwortlich gemacht wurden, sind die NSCCs (*englisch: non-selective cation channels*). Allerdings ist die Identität dieser Proteine bis heute nicht vollständig geklärt (Demidchik und Tester 2002; Zhang et al. 2010). Ein Teil der in elektrophysiologischen Messungen der durch NSCCs vermittelten Ströme könnte auf Mitglieder der pflanzlichen zyklischen Nukleotid-gesteuerten Kanäle, die CNGCs (*englisch: cyclic nucleotide gated channels*), zurückzuführen sein. Diese nichtselektiven Kationenkanäle werden durch cGMP oder cAMP aktiviert, und es konnte gezeigt werden, dass die Expression von AtCNGC19 und AtCNGC20 durch NaCl induziert wird (Kugler et al. 2009). Allerdings zeigten Verlustmutanten dieser Kanäle keine veränderten Na⁺- oder K⁺-Konzentrationen im Spross, und die elektrophysiologische Charakterisierung von AtCNGC2 ergab eine höhere Leitfähigkeit für K⁺ über Na⁺ (Leng et al. 2002). Somit bedarf es weiterer Untersuchungen um

die physiologische Funktion der CNGCs sowie die Identität der NSCCs abschließend zu klären.

Relativ gut untersucht sind dagegen die in Pflanzen exprimierten HKTs (*englisch: high affinity (K)potassium transporter*). Allerdings ist deren Rolle bei der Natriumaufnahme in die Wurzeln umstritten. Diese große Gruppe der HKT-Transportproteine kann nach ihrer Struktur und ihren Transporteigenschaften in zwei Gruppen unterteilt werden. Proteine, die zur Gruppe der HKT1 gehören sind hochaffine Na⁺-Kanäle, während die Mitglieder der HKT2-Gruppe vornehmlich Na⁺/K⁺ Co-Transportproteine darstellen (Platten et al. 2006). Im Arabidopsis Genom findet sich nur ein Homolog der HKT Familie (AtHKT1;1) und dieses wird hauptsächlich in Wurzeln exprimiert und ist stark Na⁺-selektiv (Uozumi et al. 2000). Die Funktion der HKT1-Homologe *in planta* ist aber umstritten. Eine frühe Studie von Rus et al. im Jahr 2001 zeigte eine niedrigere Na⁺-Konzentration in *Athkt1;1*-Mutanten und deutete auf eine Beteiligung von AtHKT1;1 an der Aufnahme von Na⁺ in Wurzelkortexzellen hin. Allerdings wurde später gezeigt, dass *Athkt1;1*-Verlustmutanten einen hypersensitiven NaCl-Phänotyp haben und darüber hinaus erhöhte Na⁺-Konzentrationen im Spross aufweisen (Rus et al. 2004; Davenport et al. 2007), was eher die Beteiligung von HKTs der Gruppe 1 an der Entladung des Xylems nahelegt. Auch in der monokotylen Nutzpflanze Reis (*Oryza sativa*) konnte ein in Xylemparenchymzellen lokalisierter HKT1 (OsHKT1;5) nachgewiesen werden, welcher die Natriumkonzentration des Xylemsaftes senken kann und daher ebenfalls an der Entladung von Na⁺ aus dem Xylem beteiligt zu sein scheint (Ren et al. 2005).

Neben der Regulation der Aufnahme von Natrium-Ionen über die Wurzeln spielt ein Rücktransport von Na⁺ aus dem Xylem sowie von den Wurzelhaaren zurück in den Boden eine entscheidende Rolle bei der Toleranz von Pflanzen gegenüber hohen Natriumkonzentrationen im Boden. Ein Teil des über die Wurzelhaarzellen aufgenommen Natriums wird direkt aus der Wurzel zurück in den Boden geschleust. 2002 wurde in Arabidopsis der Na⁺/H⁺-Austauscher SOS1 (*englisch: salt overly sensitive 1*) identifiziert und seine Rolle beim Export von Na⁺ aus Zellen nachgewiesen. Es konnte gezeigt werden, dass *Atsos1*-Mutanten langfristig mehr Na⁺ im Xylem und in Wurzeln akkumulieren als Wildtyp-Pflanzen (Shi et al. 2002). AtSOS1 ist hauptsächlich in den Plasmamembranen der Zellen in der Wurzelspitze und in Xylemparenchymzellen lokalisiert und Protoplasten von *Atsos1*-Mutanten weisen eine verminderte Na⁺-Leitfähigkeit auf (Shi et al. 2002). AtSOS1 wird durch das kalziumbindende Calcineurin-B ähnliche Protein SOS3 (AtCBL4) und die CBL-interagierende Proteinkinase SOS2 (AtCIPK24) reguliert. Unter Salzstressbedingungen führt der zytosolische Ca²⁺-Anstieg zur Aktivierung von SOS2 durch SOS3 was zur Phosphorylierung von SOS1 und zum Transport von Na⁺ aus den Zellen in den Apoplasten führt (Halfter et al. 2000; Qiu et al. 2002;

Zhu 2003). Ähnlich wie die HKTs können SOS1-Proteine zusammen mit dem SOS-Signalweg verschiedene Funktionen haben und scheinen auch an der Natrium Be- und Entladung des Xylems beteiligt zu sein, um die Na^+ -Konzentration in den Wurzeln und dem Mesophyll der Blätter gering zu halten (Shi et al. 2002). So konnte in einer vergleichenden Studie zwischen *Arabidopsis* und der nahe verwandten, aber salztoleranten *Thellungiella salsuginea* (früher *Thellungiella halopila*) eine deutlich höhere Expression von SOS1 in *T. salsuginea* bereits unter Kontrollbedingungen nachgewiesen werden. Zusätzlich führte NaCl zu einer stärkeren Induktion von ThSOS1 im Vergleich zu AtSOS1 (Oh et al. 2009). Diese erhöhte Expressionsstärke von ThSOS1 spiegelt sich in der Struktur von regulatorischen Sequenzen der 5'-UTR wieder. Ein Vergleich der 5'-UTR der SOS1 Sequenzen von diversen Glykophyten mit der von ThSOS1 sowie sieben weiteren Halophyten, deutete auf eine erhöhte Expressionsrate durch pyrimidinreiche Abschnitte und eine erhöhte Stabilität der Transkripte durch Bildung einer Haarnadelstruktur der Halophyten-Sequenzen hin (Dassanayake et al. 2011).

Besonders bei langanhaltenden Salzbedingungen oder sehr hohen NaCl-Konzentrationen im Boden ist es möglich, dass die oben beschriebenen Mechanismen zur Vermeidung der Aufnahme bzw. des Exports von Natrium-Ionen allein nicht ausreichen, um damit die Natriumkonzentration des Zytoplasmas unter der toxischen Konzentration zu halten. Zusätzlich kann das aufgenommene Natrium aber auch über Tonoplast-lokalisierte Natrium-Transportsysteme in die Vakuolen von Pflanzenzellen transportiert werden. Diese Kompartimentierung entfernt nicht nur überschüssiges, toxisches Na^+ aus dem Zytoplasma, sondern das zunächst schädliche Na^+ kann dort positiv als Osmotikum genutzt werden und hilft den Zellturgor unter Salzstressbedingungen aufrecht zu erhalten (Apse und Blumwald 2007). Die Kompartimentierung von Na^+ in die Vakuolen scheint außerdem mit dem SOS-Signalweg verknüpft zu sein. SOS2 stimuliert den Protonentransport ins Zytoplasma durch vakuoläre H^+ -ATPasen, was wiederum zur Aktivierung des H^+ -abhängigen Imports von Na^+ in die Vakuolen führt (Batelli et al. 2007). Letzterer wird durch Kationen/ H^+ -Antiporter vermittelt. Der erste in Tonoplasten lokalisierte Na^+/H^+ -Antiporter, der in *Arabidopsis* gefunden wurde, war AtNHX1 (*englisch: (Na)sodium/(H)proton exchanger 1*) (Apse et al. 1999). Insgesamt gibt es acht NHX-Homologe in *Arabidopsis*, welche in zwei Gruppen eingeteilt werden können. AtNHX1-4 sind im Tonoplasten lokalisiert, während die anderen endosomal oder in der Plasmamembran vorkommen (Pardo et al. 2006). AtNHX1 galt lange Zeit als stark selektiv für Na^+ über K^+ (Apse et al. 1999), allerdings deuten neuere Studien auf eine ebenso hohe Leitfähigkeit für K^+ hin (Jiang et al. 2010). In den meisten Fällen übersteigt die zytosolische Kaliumkonzentration aber die von Na^+ , wodurch AtNHX1 zumindest unter normalen Wachstumsbedingungen eher die Aufnahme von Kalium in die Vakuole vermittelt (Jiang et al.

2010). Die Selektivität von AtNHX1 wird kalziumabhängig durch das Calmodulin-ähnliche Protein AtCaM15 reguliert. Dessen Bindung führt zu einer Abnahme der Na⁺/H⁺-Transportrate, nicht aber zur Abnahme der K⁺/H⁺-Transportrate. Diese Interaktion nimmt mit zunehmendem pH in den Vakuolen ab und könnte einen Mechanismus darstellen, über den die Ionenhomöostase unter NaCl-Stress reguliert wird (Yamaguchi et al. 2005).

1.5.3 Das K⁺/Na⁺-Verhältnis

Als weitere wichtige Eigenschaft salztoleranter Pflanzen wird häufig die Fähigkeit zur Aufrechterhaltung eines hohen zytosolischen K⁺/Na⁺-Verhältnisses diskutiert (Maathuis und Amtmann 1999; Shabala und Cuin 2008; Shabala und Pottosin 2014). Die K⁺-Konzentration von pflanzlichen Zellen liegt typischerweise bei rund 150mM, während die Na⁺-Konzentration mit ca. 10mM um ein fünfzehnfaches geringer ist (Conn und Gilliam 2010). Tatsächlich berichten zahlreiche Studien von einer Abnahme des Kaliumgehalts im Pflanzengewebe unter Salzstress. Sowohl im Spross als auch in Wurzelgewebe von salzsensitiven Gerste-Varietäten (Tavakkoli et al. 2011), aber auch von sensitiven Weizen-Sorten (Cuin et al. 2008) sowie Arabidopsis (Zhu et al. 1998; Volkov et al. 2004) konnte eine NaCl-induzierte Kaliumabnahme nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu führt Salzstress bei vielen halophytischen Arten nicht zu einer Abnahme des Kaliumgehalts. Einige dieser Arten, wie beispielsweise *Atriplex nummularia* (Ramos et al. 2004) und *Chenopodium quinoa* (Hariadi et al. 2011) weisen unter moderaten Salzstressbedingungen sogar höhere Kaliumkonzentrationen als unter Kontrollbedingungen auf. In einer vergleichenden Studie mit der salzsensitiven Arabidopsis und ihrer halophytischen Schwesterart *T. salsuginea* wurde zwar eine Abnahme der Kaliumkonzentration der Wurzeln von *T. salsuginea* durch zunehmende NaCl-Konzentrationen im Nährmedium nachgewiesen, diese war aber verglichen mit Arabidopsis sehr gering (Aleman et al. 2009b).

Um trotz erhöhter Natriumkonzentrationen im Boden ein hohes K⁺/Na⁺-Verhältnis aufrecht zu erhalten, muss die Kaliumaufnahme über strikt zwischen Natrium und Kalium diskriminierende Systeme vermittelt werden. Bereits 1963 konnten Epstein und Kollegen an Wurzeln von Gerste eine biphasische Kaliumaufnahme durch ein hochaffines sowie ein niederaffines Aufnahmesystem nachweisen (Epstein et al. 1963). Mittlerweile konnten Teile beider Aufnahmesysteme identifiziert und charakterisiert werden und neuerdings wird ihre Rolle bei der Salztoleranz von Pflanzen diskutiert (Amtmann et al. 2018). Ein großer Teil der niederaffinen Kaliumaufnahme in Arabidopsis wird durch AtAKT1 vermittelt, einem hauptsächlich in Wurzelkortex- und Wurzelhaarzellen lokalisierten Kaliumaufnahme kanal der *Shaker*-Familie (Lagarde et al. 1996; Hirsch et al. 1998; Ivashikina et al. 2001). Einige Studien deuten auf einen Zusammenhang zwischen der Regulation von AKT1 und einer gesteigerten

Salztoleranz hin. So führte Salzstress bei den salztoleranten Reis-Kultivaren *Bk* und *Pokkali* zu einer Reprimierung von OsAKT1 in der Exodermis, während diese Reaktion bei salzsensitiveren Kultivaren ausblieb (Golldack et al. 2003). Auch für das halophytische Eiskraut (*Mesembryanthemum crystallinum*) konnte eine NaCl-induzierte Abnahme des AtAKT1-Orthologs McMKT1 sowohl auf Protein- als auch auf Transkriptebene in Wurzelgewebe gezeigt werden (Su et al. 2001). Worin allerdings der Vorteil dieser negativen Regulation der AKT1-Transkription durch Salzstress liegt, ist noch nicht vollständig entschlüsselt.

Nicht nur die Aufnahme von Na⁺ in die Wurzelzellen führt bei NaCl-Stress zu einer Verschiebung des K⁺/Na⁺-Verhältnisses. Eine steigende NaCl-Konzentration im Boden führt darüber hinaus zu einer Abnahme des für die Pflanzen verfügbaren Kaliums im Boden (Shabala und Cuin 2008), weshalb der Fokus vieler Studien über die pflanzliche Salzstressadaptation auf der Funktion der hochaffinen Kaliumaufnahme-systeme in Wurzeln und deren Rolle in der Kaliumhomöostase unter Salzstress liegt.

In Arabidopsis konnte AtHAK5 als wesentliche Komponente der hochaffinen Kaliumaufnahme identifiziert werden (Gierth et al. 2005). Der hauptsächlich in Wurzeln lokalisierte Kaliumtransporter AtHAK5 (Qi et al. 2008) gehört zu den Mitgliedern der Gruppe I der HAK/KT/KUP-Familie und wurde in Hefe-Komplementationsstudien als permeabel für K⁺ beschrieben. Kaliummangel führt in Arabidopsis zu einer Induktion der Genexpression von HAK5 (Gierth et al. 2005) während Salzstress die Expression drastisch hemmt (Nieves-Cordones et al. 2010). In der salztoleranten *T. salsuginea* wurde nur ein geringer negativer Effekt von NaCl auf die Expression des HAK5-Orthologs ThHAK5 nachgewiesen (Aleman et al. 2009a). Und in der halophytischen *M. crystallinum* konnte sogar eine Zunahme des mRNA-Gehalts mehrerer HAK-Homologe in verschiedenen Geweben durch Salzstress gezeigt werden (Su et al. 2002).

1.5.4 Kompatible gelöste Substanzen

Eine effiziente Aufnahme von Kalium unter Salzstressbedingungen ist nicht nur für die Aufrechterhaltung eines hohen K⁺/Na⁺-Verhältnisses wichtig. Kalium ist das am häufigsten vorkommende anorganische Kation in Pflanzenzellen (Leigh und Jones 1984), und viele Turgor-gesteuerte Prozesse, wie Stomabewegungen und Zellstreckung werden hauptsächlich durch Verschiebungen des osmotisch wirksamen Kaliums zwischen Zellkompartimenten oder Zellen reguliert (Hu und Schmidhalter 2005). Um unter Salzstressbedingungen weiter Wasser aus dem Boden aufnehmen zu können, senken Pflanzen das osmotische Potential der Zellen und damit das Wasserpotential stark ab (Munns 1988). Für diese osmotische Adaption werden, neben anorganischen Ionen (wie bspw. K⁺), so genannte kompatible gelöste

Substanzen (englisch: *compatible compounds/solutes*) genutzt. Kompatible Solute sind per Definition organische, osmotisch wirksame Verbindungen von geringer molarer Masse, die auch in hohen Konzentrationen keinen negativen Effekt auf den Zellstoffwechsel haben (Bohnert et al. 1995; Wang et al. 2003; Chen und Jiang 2010). Zu diesen kompatiblen Soluten gehören Zucker und Zuckerderivate so wie methylierte quartäre Stickstoffverbindungen wie Glycinbetain und Aminosäuren wie Prolin (Chen und Jiang 2010). Dabei wird vor allem die Akkumulation großer Mengen Prolin mit einer gesteigerten Salztoleranz in Verbindung gebracht (Verbruggen und Hermans 2008). So konnte beispielsweise die NaCl-induzierte Zunahme des Prolingehalts des Eiskrauts *M. crystallinum* nachgewiesen werden (Thomas und Bohnert 1993). In einer vergleichenden Studie mit Arabidopsis und *T. salsuginea* führte die Behandlung mit 150mM NaCl im Gießwasser zwar zu einem Anstieg des Prolingehalts beider Arten, aber die Zunahme war deutlich stärker in der salztoleranten *T. salsuginea* (Gong et al. 2005).

Prolin wird in Pflanzen hauptsächlich durch Umwandlung von Glutamat synthetisiert. Dabei wird Glutamat durch D1-Pyrrolin-5-Carboxylat Synthasen (P5CS) in Pyrrolin-5-Carboxylat (P5C) umgewandelt, welches dann durch D1-Pyrrolin-5-Carboxylat Reduktasen weiter zu Prolin reduziert wird (Kishor und Sreenivasulu 2014). Die Umwandlung von Glutamat in P5C wird als der ratenlimitierende Schritt angesehen. Im Arabidopsis Genom konnten zwei P5CS-Orthologe identifiziert werden und es wurde gezeigt, dass überwiegend die Expression von AtP5CS1 und in geringerem Ausmaß auch AtP5CS2 durch NaCl und ABA induziert werden (Strizhov et al. 1997). Die Funktion dieser beiden Enzyme scheint aber nicht vollständig redundant zu sein. Die Verlustmutation von *AtP5CS2* führte zu einer hohen Embryo-Letalität was auf eine vorwiegende Rolle von P5CS2 in der Embryogenese hindeutet. Die durch osmotischen Stress induzierte Prolinsynthese in adulten Arabidopsis-Pflanzen scheint dagegen überwiegend durch AtP5CS1 vermittelt zu werden (Szekely et al. 2008). Die Prolinhomeostase in pflanzlichen Zellen wird zusätzlich über den Abbau von Prolin durch Prolin-Dehydrogenasen (PDH) gesteuert (Mansour und Ali 2017). In Arabidopsis konnte gezeigt werden, dass Prolin selbst in einem negativen Rückkopplungsmechanismus induzierend auf die Expression von AtPDH wirkt. Osmotischer Stress und ABA hatten dagegen einen negativen Effekt auf die PDH-Expression (Kiyosue et al. 1996; Nakashima et al. 1998) und ein Zusammenhang zwischen der höheren Akkumulation von Prolin in salztoleranten Pflanzen und einer gesteigerten Expression bzw. Repression konnte für *Thellungiella* im Vergleich zu Arabidopsis gezeigt werden (Kant et al. 2006).

Darüber hinaus wird der Prolingehalt einzelner Gewebe oder Zellkompartimente auch über einen gerichteten Prolintransport durch eine Vielzahl von mehr oder weniger selektiven

Transportproteinen reguliert (Lehmann et al. 2010). Sowohl für Mitglieder der Aminosäure-Permeasen (AAPs), als auch der Lysin-Histidin Transporter (LHTs) konnte gezeigt werden, dass diese neben anderen Aminosäuren auch Prolin als Substrat erkennen können und sich die Affinität der Transporter nur unwesentlich zwischen verschiedenen Aminosäuren unterscheidet (Okumoto et al. 2002; Hirner et al. 2006). Die Mitglieder der Prolin-Transporter Superfamilie (ProTs) haben im Gegensatz zu den LHTs und AAPs eine hohe Selektivität für Prolin gegenüber anderen Aminosäuren (Lehmann et al. 2010). Bereits charakterisierte Vertreter der pflanzlichen ProTs vermitteln neben dem Transport von Prolin auch den Transport anderer kompatibler Solute wie γ -Aminobuttersäure (GABA) und Glycinbetain (Breitkreuz et al. 1999; Grallath et al. 2005). Beispielsweise ist der durch Salzstress induzierte Anstieg der freien Prolinkonzentration in Zellen der Wurzelspitze von Gerste (*Hordeum vulgare*) eher auf eine gesteigerte Importrate von Prolin durch HvProT als durch eine erhöhte Syntheserate durch P5C-Synthasen zurückzuführen (Ueda et al. 2007).

Auch wenn der Anstieg an kompatiblen Soluten wie Prolin häufig als adaptive Reaktion von Pflanzen auf Salzstress diskutiert wird und Prolin unter Salzstress akkumuliert, ist die Akkumulation in vielen Arten zu gering um großen Einfluss auf das osmotische Potential zu nehmen (Mansour und Ali 2017). So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass die Zunahme von Prolin durch Salzstress in der halophytischen Salzmelde (*Atriplex halimus*) nur rund 3% der osmotischen Anpassung des Blattgewebes bewirkt (Bendaly et al. 2016) und auch bei der osmotischen Adaption des salztoleranten Strandfleders (*Limonium latifolium*) scheint Prolin nur eine untergeordnete Rolle zu spielen (Gagneul et al. 2007). Zusätzlich deuten eine Reihe von Studien darauf hin, dass Prolin eine antioxidative Wirkung hat und den oxidativen Stress unter Salzbelastung senken kann. Salzstress führte in Arabidopsis *p5cs1*-Verlustmutanten, die nur eine stark eingeschränkte Prolinsynthese aufweisen, zu verstärkten Chlorosen durch Chlorophyllabbau sowie einer Erhöhung der Lipidperoxidation durch freie Radikale (Szekely et al. 2008). Umgekehrt konnte durch Zugabe von exogenem Prolin die Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies durch Salzstress in Chloroplasten von Senfkeimlingen (*Brassica juncea* cv. *Dira 367*) deutlich gesenkt werden (Alia et al. 1997). Die Rolle von Prolin bei der Reaktion auf Salzstressbedingungen scheint demnach nicht allein in der osmotischen Adaption zu liegen, sondern vielfältig zu sein (Kishor und Sreenivasulu 2014; Mansour und Ali 2017).

1.6 Die Salztoleranz von *P. dactylifera* und *C. quinoa*

Alle in den vorherigen Abschnitten beschriebenen Mechanismen zur Steigerung der Toleranz von Pflanzen gegenüber Salzstress können zwischen einzelnen Arten und sogar Individuen stark variieren. Auch bleibt fraglich, ob die schwerpunktmäßige Forschung an nicht-toleranten Arten wie *Arabidopsis* oder Mais die zugrundeliegenden Mechanismen toleranter Arten überhaupt aufdecken kann (Munns und Tester 2008; Rozema und Schat 2013). Durch die steigende Zahl der verfügbaren Genome von Pflanzen, unter denen auch salztolerante Arten sind, wurde das Untersuchen molekularer Grundlagen der Toleranzmechanismen dieser Pflanzen in den letzten Jahren möglich. Im Rahmen der hier vorgelegten Arbeit sollten daher Einblicke in die Strategien und Mechanismen zur Steigerung der Salztoleranz der beiden sehr unterschiedlichen Nutzpflanzen-Arten *Phoenix dactylifera* sowie *Chenopodium quinoa* gewonnen werden.

1.6.1 *Phoenix dactylifera*

Aufgrund der teilweise ähnlichen Natur von Trockenstress und Salzstress, ist es wenig überraschend, dass die trocken- und hitzeadaptierte Dattelpalme (siehe 1.4) auch eine hohe Toleranz gegenüber Salzstress aufweist. Bereits 1954 wurde die Dattelpalme als die weltweit salztoleranteste Nutzpflanze beschrieben (Richards 1954). Ramoliya und Pandey zeigten 2003, dass die Keimung bestimmter Dattelpalmen-Kultivare deutlich weniger salzsensitiv ist als die von Gerste, und die Keimung der Dattelsamen verglichen mit Gerstesamen erst bei einer mehr als doppelt so hohen Bodenleitfähigkeit um 50% reduziert war. In einer anderen Studie tolerierten zwei unterschiedliche Dattel-Kultivare sogar eine Bodenleitfähigkeit von 15 dS*m⁻¹ (Abbas et al. 2015). Trotz der hohen Salztoleranz von Dattelpalmen wird die steigende Salzbelastung durch übermäßige Bewässerung mit NaCl-haltigem Gießwasser (Haj-Amor et al. 2017) zunehmend zum Problem beim Anbau und der Ertrag der Pflanzen nimmt seit längerem ab (El-Juhany 2010). Aber ähnlich wie bei der Adaption an Trockenstress wurden bislang nur recht wenige Studien an Dattelpalmen im Zusammenhang mit Salzstress adulter Pflanzen durchgeführt (Yaish und Kumar 2015).

An *P. dactylifera* Keimlingen des als salztolerant geltenden Kultivars *Khalas* konnte gezeigt werden, dass diese einen erhöhten Prolingehalt durch verschiedene abiotische Stressfaktoren aufwiesen und dass Salzstress den größten Effekt auf die Prolinakkumulation vor allem in Wurzeln hatte (Yaish 2015). Unklar ist allerdings ob adulte Dattelpalmen unter Salzstress Na⁺ und Cl⁻ überhaupt aufnehmen. In einer Studie mit Keimlingen von 12 verschiedenen Dattel-Kultivaren nahm der Natriumgehalt in Wurzeln für alle untersuchten Kultivare deutlich zu, während die Zunahme im Blattgewebe nur sehr gering war (Alhammadi und Edward 2009). Eine Studie von Sperling et al. (2014) erzielte ähnliche Ergebnisse. Dabei konnte kaum eine

Zunahme von Na^+ in den Fiederblättern festgestellt werden. Andere Untersuchungen zeigten aber eine deutliche Zunahme von Natrium in Fiederblättern von Dattelpalmen (Tripler et al. 2007; Youssef und Awad 2008) und es bleibt bis heute Gegenstand der Forschung ob und wie Dattelpalmen Natrium-Ionen unter Salzstressbedingungen aufnehmen.

2011 und 2013 wurde in zwei unabhängigen Arbeiten das Genom von Dattelpalmen des Kultivars *Khalas* assembliert (Al-Dous et al. 2011; Al-Mssallem et al. 2013), was die Grundlage für molekularbiologische Untersuchungen der Adaption von Dattelpalmen an abiotischen Stress wie beispielsweise Salzstress darstellt. Mittlerweile wurden zwei Studien veröffentlicht, in denen die Änderungen des Transkriptoms von Wurzel- bzw. Blattgewebe von Dattelpalmen durch Salzstress mittels mRNA-Sequenzierung untersucht wurden (Radwan et al. 2015; Yaish et al. 2017). Es konnte gezeigt werden, dass im Wurzelgewebe des salztoleranten Dattel Kultivars *Deglet Beida* die Expression zahlreicher Gene bereits wenige Stunden nach einem Salzschock reagiert. Unter diesen fanden sich Transkripte des ABA-Signalwegs aber auch andere, mit abiotischem Stress korrelierte Transkripte, die in anderen, nicht-toleranten Arten wie *Arabidopsis* ähnlich reagieren (Radwan et al. 2015). Außerdem konnte in einer weiteren Studie mit dem Kultivar *Khalas* eine Induktion vieler Photosynthese-assoziiierter Transkripte in Fiederblättern nach zehntägiger Salzbehandlung nachgewiesen werden, die aber nicht zu einer Steigerung der Photosyntheseleistung führte (Yaish et al. 2017). Trotz dieser ersten Studien über die molekularen Grundlagen der Salzadaption von Dattelpalmen, ist auch darüber noch sehr wenig bekannt. Außerdem fehlen vor allem Studien über die Auswirkungen von länger anhaltendem Salzstress auf adulte Pflanzen sowie deren Anpassungsmechanismen gänzlich.

1.6.2 *Chenopodium quinoa*

Quinoa ist eine dikotyle, einjährige Pflanze, die wegen ihrer nährstoffreichen Samen schon seit Tausenden von Jahren in den Anden kultiviert wird (Jacobsen 2003). Die phylogenetische Einordnung der Gattung *Chenopodium* wurde in den vergangenen Jahren mehrfach geändert, heute wird sie der Familie der *Amaranthaceae* zugeordnet. Die ursprüngliche Gattung *Chenopodium* wurde durch systematische Sequenzanalysen in sieben Gattungen aufgeteilt (Fuentes-Bazan et al. 2012). Dennoch umfasst die Gattung *Chenopodium* immer noch weit über 50 Arten (Jellen et al. 2015). Der Anbau von Quinoa nimmt aufgrund gesteigerter Nachfrage weltweit zu und stieg von 79 000 Tonnen im Jahr 2010 auf 193 000 Tonnen im Jahr 2014 an (FAO 2017). Im Vergleich zu den heute hauptsächlich angebauten Nutzpflanzen wie Weizen oder Gerste, weist Quinoa eine hohe Toleranz gegenüber vielen abiotischen Stressfaktoren wie Kälte und Trockenheit auf und ist als halophytische Art besonders tolerant gegenüber salzigen Böden (Jacobsen 2003). Bei moderatem Salzstress (bis ca. 100mM NaCl

im Gießwasser) profitiert Quinoa sogar von der erhöhten Verfügbarkeit von Na⁺ und Cl⁻ im Boden und zeigt ein gesteigertes Wachstum (Hariadi et al. 2011). Aber ähnlich wie bei Dattelpalmen ist das Wissen über zugrunde liegende Mechanismen noch sehr lückenhaft.

Wie oben bereits für andere tolerante Arten beschrieben (siehe 1.5.4) konnte auch für Quinoa gezeigt werden, dass eine fünfwöchige Bewässerung mit 400mM NaCl zu einem starken Anstieg des Prolingehalts um ca. das 15fache im Vergleich zu Kontrollpflanzen führt (Kiani-Pouya et al. 2017). Eine andere Studie fand darüber hinaus eine Zunahme des Kaliumgehalts in Wurzel- und Sprossgewebe um das Dreifache unter Salzstressbedingungen (Orsini et al. 2011). Vergleichende Studien zwischen verschiedenen Quinoa Kultivaren deuten außerdem auf einen konstitutiv erhöhten ABA-Gehalt der toleranten Kultivare hin (Ruiz et al. 2017) und in einer Studie über die Auswirkungen von Salzstress auf die Genexpression von Natrium-Transportproteinen wie CqSOS1 oder CqNHX1 wurden Unterschiede in der Expressionsantwort von toleranten und sensitiven Kultivaren gefunden (Ruiz-Carrasco et al. 2011). Ionenflussmessungen von Mesophyllzellen mittels der MIFE-Technik (*englisch: Microelectrode Ion Flux Estimation*) deuten zusätzlich an, dass salztolerante *C. quinoa* Kultivare geringere Natriumaufnahme-Raten und einen reduzierten Kaliumefflux durch hohe apoplastische NaCl-Konzentration aufweisen. Zusätzlich zeigten die Messungen einen höheren Natriumausstrom des toleranten Kultivars (Bonales-Alatorre et al. 2013). mRNA-Sequenzierungen von salztoleranten und salzsensitiven Quinoa Kultivaren ergaben Einzelnukleotidpolymorphismen (SNPs, *englisch: single nucleotid polymorphism*) in 15 Genen mit einer oder mehreren Transmembrandomänen, die möglicherweise mit der Variation in der Salztoleranz der untersuchten Kultivare zusammenhängen, und unter diesen befanden sich eine Reihe von putativen Ionen-Transportproteinen (Schmockel et al. 2017).

Sämtliche oben beschriebenen Untersuchungen über die Eigenschaften, die in Quinoa eine gesteigerte Salztoleranz vermitteln, handeln von Anpassungen des Wurzel- und Blattgewebes. Wie die meisten Arten der Gattung *Chenopodium*, besitzt aber auch Quinoa sogenannte Blasenhaare (Orsini et al. 2011; Shabala et al. 2014). Ca. 50% aller Halophyten weisen ähnliche Strukturen auf der Epidermis ihrer Blätter auf (Flowers et al. 2010) und deren Rolle bei der erhöhten Toleranz dieser Arten gegenüber Salzstress wird seit längerem diskutiert (Shabala et al. 2014).

1.6.3 Die Rolle von Blasenhaaren bei der Salztoleranz von *Chenopodium quinoa*

Blasenhaare sind spezialisierte Trichome (Glover 2000), bestehend aus einer sehr großen Blaszelle (englisch: *epidermal bladder cell*, EBC), die über eine Stielzelle (englisch: *stalk cell*, SC) mit einer Epidermiszelle verbunden sind (Abbildung 1-2) (Shabala et al. 2014). Durch das häufige Auftreten der EBCs bei halophytischen Pflanzenarten wird deren Beteiligung an der Salztoleranz dieser Pflanzen schon länger diskutiert (Shabala 2013; Yuan et al. 2016). So konnte für die EBC-tragenden, halophytischen Arten *M. crystallinum* und *Atriplex spp.* schon früh gezeigt werden, dass die Konzentration von Na^+ (und Cl^-) in den EBCs durch Salzbehandlung stark zunimmt und im Vergleich zum Blattgewebe sogar eine Aufkonzentrierung dieser Ionen in den EBCs stattfindet (Osmond et al. 1969; Adams et al. 1998; Tsutsumi et al. 2015; Pan et al. 2016). Allerdings wies eine EBC-freie Mutante von *M. crystallinum* im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen eine niedrigere Konzentration von Na^+ und Cl^- im restlichen Blattgewebe unter Salzstressbedingungen auf (Agarie et al. 2007), wodurch die Rolle der EBCs als Speicherort für NaCl trotz des salzsensitiveren Phänotyps der EBC-losen *M. crystallinum* Mutante nicht eindeutig gezeigt werden konnte. Auch über die Rolle der EBCs an der Salztoleranz von Quinoa ist bis heute relativ wenig bekannt (Dassanayake und Larkin 2017). Es ist nicht eindeutig geklärt, ob die EBCs von Quinoa überschüssige Ionen aufnehmen und im Vergleich zum photosynthetisch aktiven Blattgewebe anreichern. Aufgrund der großen Anzahl an verschiedenen, genetisch diversen Quinoa Kultivaren (Fuentes et al. 2009), die in einzelnen Studien verwendet wurden, sind die Ergebnisse schwer vergleichbar und ein genereller Mechanismus konnte bis heute nicht aufgezeigt werden (Ruiz et al. 2016). So wurde für ein aus Chile stammendes Quinoa Kultivar (*BO78*) gezeigt, dass ca. 20% des insgesamt in den Pflanzen vorhandenen Na^+ und Cl^- in die EBCs transportiert wurde (Orsini et al. 2011), während andere Studien über die Lokalisation von Na^+ und Cl^- in Quinoa gar nicht zwischen EBCs und dem übrigen Blattgewebe unterscheiden (Hariadi et al. 2011). Eine neuere Studie konnte jedoch zeigen, dass das konsequente mechanische Entfernen der EBCs die Salzsensitivität von Quinoa erhöht und deutet damit auf eine wesentliche Rolle der EBCs bei der Anpassung an Salzstress hin (Kiani-Pouya et al. 2017).

1.6.4 Die Beladung von Blasenhaaren mit Na^+ - und Cl^- -Ionen

Ausgehend von der Annahme, dass NaCl in den Salzblasen akkumuliert, postulierten Shabala und Kollegen 2014 ein Modell für mögliche Transportsysteme, die an der EBC-Beladung beteiligt sein könnten. Aufgrund ihrer Ladung müssen Ionen die Membran der EBCs über Transportproteine passieren. In diesem Modell wird den SCs eine zentrale Funktion in der Kontrolle des Ionentransports in die EBCs zugeschrieben, da diese die einzigen direkt mit der EBC verbundenen Zellen sind. Demnach müssen die Transportproteine polar in den

Membranen der Zellen angeordnet sein, um Na^+ und Cl^- gerichtet in die EBCs transportieren und möglicherweise sogar aufkonzentrieren zu können (Abbildung 1-2).

Für einen Transport von Na^+ und Cl^- entgegen ihres elektrochemischen Gradienten (im Falle einer Aufkonzentrierung in den EBCs), sind neben passiven Transportproteinen wie Kanälen auch (sekundär) aktive Transportproteine wie Protonen gekoppelte Transporter und Protonenpumpen notwendig. Aufgrund der thermodynamischen Eigenschaften der Transportvorgänge, konnten Shabala und Kollegen (2014) sogar mögliche, aus anderen, hauptsächlich nicht-salztoleranten Arten bekannte Kandidaten benennen, die den Na^+ - bzw. Cl^- -Transport unter physiologischen Bedingungen vermitteln könnten (siehe 1.5.1 und 1.5.2).

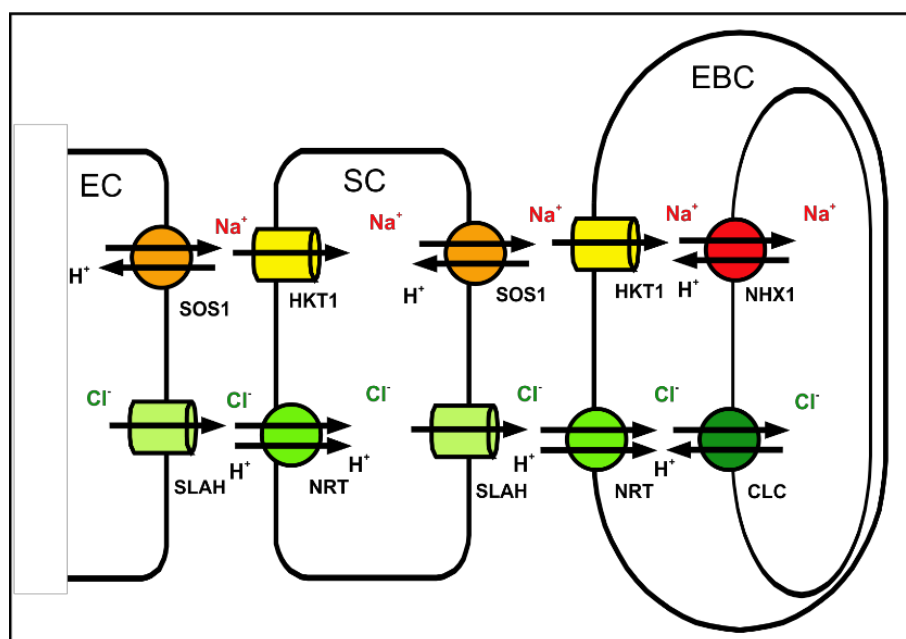


Abbildung 1-2: Modell möglicher an der Salzbeladung der epidermalen Blasen zellen (EBCs) von *C. quinoa* beteiligten Transportproteine.

Um überschüssiges Na^+ und Cl^- in EBCs speichern zu können, müssen die beteiligten Transportproteine polar in den Plasmamembranen von Epidermiszellen (EC), Stielzellen (SC), und EBCs angeordnet sein. Der (sekundär) aktive Natriumtransport zwischen Zellen entgegen dem elektrochemischen Gradienten könnte durch SOS1-Orthologe (orange) und die Aufnahme in die Vakuole der EBCs durch NHX-Orthologe (rot) unter Nutzung der protonenmotorischen Kraft vermittelt werden. Passive Transportvorgänge könnten durch HKT1-Orthologe (gelb) vermittelt werden. Analog dazu könnte der Chlorid-Transport durch SLAC/SLAH-Orthologe (hellgrün) sowie NRTs und CLCs vermittelt werden (grün und dunkelgrün).

Während Mitglieder der SLAC/SLAH-Familie für die passive Abgabe von Cl^- aus den ECs und später den SCs verantwortlich sein könnten (Abbildung 1-2, hellgrün), müssten für die Aufnahme von Cl^- in die SCs und EBCs aufgrund der negativen Membranspannung (sekundär) aktive Transportprozesse notwendig sein, die beispielsweise durch Mitglieder der Nitrat Transporter 1/Peptid Transporter Familie (NPFs) vermittelt werden könnten (Abbildung 1-2). Bereits charakterisierte NPFs weisen ein recht großes Substratspektrum auf (Corratge-Faillie

und Lacombe 2017). Es konnte beispielsweise für AtNPF2.4 gezeigt werden, dass dieser in der Plasmamembran der Wurzelstele lokalisiert ist und Natrium-aktiviert Chloridströme vermittelt (Li et al. 2016).

Auch für den Natriumtransport in die EBCs und eine Aufkonzentrierung innerhalb der EBCs postulierten Shabala et al. (2014) mögliche Kandidaten. Der Natriumtransport entgegen seinem elektrochemischen Gradienten aus den Epidermiszellen in die SCs und aus den SCs in die EBCs könnte demnach unter Nutzung der protonenmotorischen Kraft durch SOS1-Orthologe (Abbildung 1-2, orange) und passive Natriumtransportvorgänge, durch Mitglieder der HKT-Familie (Abbildung 1-2, gelb) vermittelt werden. Um die Konzentration von Natrium- und Chlorid-Ionen im Zytoplasma der EBCs gering zu halten und so die Aufnahme dieser Ionen in die EBCs zu erleichtern, könnten Tonoplast-lokalisierte Natrium- und Chlorid-Transporter wie beispielsweise Mitglieder der NHX- und der CLC-Familie eine Kompartimentierung dieser Ionen in die Vakuole der EBCs ermöglichen (Shabala et al. 2014).

1.6.5 Zielsetzung III: Untersuchungen der NaCl-Toleranzmechanismen von *C. quinoa* und *P. dactylifera*

Im Rahmen dieser Arbeit sollten die Auswirkungen von Salzstress sowie die molekularen Grundlagen der Salztoleranz von Dattelpalmen sowie *Chenopodium quinoa* untersucht werden. Besonderes Augenmerk wurde dabei auf die Aufnahme und Verteilung von Natrium gelegt.

Bisherige Studien über die Aufnahme und Lokalisation von Natrium in der Dattelpalme wurden hauptsächlich an Keimlingen durchgeführt und die Ergebnisse sind teils widersprüchlich. Außerdem fehlen Untersuchungen an adulten Pflanzen gänzlich. Im Rahmen der hier vorliegenden Studie sollten die Mechanismen adulter Dattelpalmen untersucht werden. Mittels flammenphotometrischer Untersuchungen sollten Einblicke in die Lokalisation von Natrium in salzgestressten Dattelpalmen gewonnen werden. Da die Wurzeln von *Phoenix dactylifera* keine eindeutige Wurzelhaarzone aufweisen, in der bei anderen Arten der Großteil der Nährstoffaufnahme stattfindet (Gilroy und Jones 2000), wurden für die Untersuchungen einzelne Wurzeln in Teilabschnitte unterteilt. Außerdem wurden verschiedene Fiederblätter von adulten und juvenilen Palmwedeln untersucht, da sich frühere Studien vor allem darin widersprechen, ob in Dattelpalmen das überschüssige Natrium überhaupt aus den Wurzeln in das Blattgewebe transportiert wird. Darüber hinaus wurden Änderungen der Genexpression in den verschiedenen Wurzelabschnitten untersucht, um mögliche Mechanismen zu identifizieren, die für die Verteilung des Natriums ursächlich sind.

Die Mechanismen, die der Salztoleranz von *Chenopodium quinoa* zugrunde liegen wurden bereits in einigen Studien untersucht. Allerdings lag der Fokus dabei nur selten auf der Rolle

der EBCs an der gesteigerten Salztoleranz. In dieser Arbeit sollte deshalb untersucht werden, ob Quinoa, genau wie andere EBC-tragende Arten, diese als externen Speicherort für überschüssiges Natrium nutzt und welche Transportproteine an dieser Beladung beteiligt sein könnten. Flammenphotometrische Untersuchungen des Natrium- und Kaliumgehalts verschiedener Gewebe sollten Aufschluss über die osmotischen Verhältnisse in *C. quinoa* bei Salzstress geben. Außerdem sollte untersucht werden, ob die Blasenhaare mit den EBCs als externe Salzspeicherorgane dienen. Darüber hinaus sollten mittels mRNA-Sequenzierung Einblicke in das gesamte Transkriptom und damit in die Funktion der EBCs gewonnen werden. Im Besonderen wurde die gewebespezifische Expression von Transportsystemen untersucht, die an der Beladung der EBCs mit Natrium und Chlorid beteiligt sind. Da die Salztoleranz von Quinoa zumindest anteilig auf einer effizienten Kaliumaufnahme basiert und Salzstress keinen negativen Einfluss auf den Kaliumgehalt von Blatt und Wurzelgewebe zu haben scheint (Orsini et al. 2011), wurde zusätzlich auch die Auswirkung von Salzstress auf Kalium-Transportsysteme untersucht.

2. Material und Methoden

2.1 Pflanzenanzucht

2.1.1 Anzucht von *Arabidopsis thaliana*

Aufgrund des Modellpflanzencharakters von *Arabidopsis thaliana* und der Verfügbarkeit vielfältiger Mutanten wurde die funktionelle Diversität einzelner ABA-Rezeptoren im Signalweg von *A. thaliana* Schließzellen untersucht. Alle Versuche wurden mit Pflanzen des Ökotyps *Columbia 0* (Col-0) sowie verschiedener Mutanten dieses Ökotyps durchgeführt.

Bei den verwendeten Mutanten handelte es sich um zwei fünffach Verlustmutanten der ABA-Rezeptoren *PYR1*, *PYL2*, *PYL4*, *PYL5* und *PYL8* (12458) bzw. *PYR1*, *PYL1*, *PYL4*, *PYL5* und *PYL8* (11458) die durch tDNA-Insertion, EMS-Mutagenese und Transposon-Insertion generiert wurden (Gonzalez-Guzman et al. 2012). Für jeden dieser Rezeptoren wurde für beide Hintergrund-Verlustmutanten Komplementationslinien generiert, in denen jeweils ein Rezeptor unter dem Schließzell-spezifischen *GC1*-Promotor komplementiert wurden (Abbildung 2-1). Für *PYL8* lag allerdings nur die Komplementationslinie in der 11458-Verlustmutante vor. Sämtliche Mutanten wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Pedro L. Rodriguez (Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (IBMCP), Valencia, Spanien) generiert und freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

NAME	Background	PYR1	PYL1	PYL2	PYL4	PYL5	PYL8
11458	11458	✘	✘	○	✘	✘	✘
PYR1::11458	11458	○	✘	○	✘	✘	✘
PYL1::11458	11458	✘	○	○	✘	✘	✘
PYL4::11458	11458	✘	✘	○	○	✘	✘
PYL5::11458	11458	✘	✘	○	✘	○	✘
PYL8::11458	11458	✘	✘	○	✘	✘	○
12458	12458	○	○	✘	✘	✘	✘
PYR1::12458	12458	○	○	○	✘	✘	✘
PYL2::12458	12458	○	○	○	○	✘	✘
PYL4::12458	12458	○	○	○	○	○	✘
PYL5::12458	12458	○	○	○	○	○	○

Abbildung 2-1: Übersicht der verwendeten *Arabidopsis* ABA-Rezeptormutanten

Die verwendeten PYR/PYL-Mutanten wurden alle aus *Arabidopsis thaliana* Pflanzen des Ökotyps Col-0 generiert und von der Arbeitsgruppe von Prof. Pedro Rodriguez zur Verfügung gestellt. Bei den beiden fünffach Verlustmutanten 11458 und 12458 handelt es sich um Verlustmutanten der Rezeptoren *PYR1*, *PYL1*, 4, 5 und 8 bzw. *PYR1*, *PYL2*, 4, 5 und 8 die durch tDNA-Insertion, EMS-Mutagenese und Transposon-Insertion generiert wurden (Gonzalez-Guzman et al. 2012). Für alle Rezeptoren wurden in beiden Hintergrund-Verlustmutanten Komplementationslinien durch die Expression einzelner Rezeptoren unter dem Schließzell-spezifischen Promotor *GC1* erzeugt. Für *PYL8* lag nur die Komplementationslinie *PYL8::11458* vor.

Die Samen wurden auf teilsterilisierter Pikiererde (Einheitserde CL P, Einheitserdewerke Patzer, Sinntal) ausgesät und ca. zwei Wochen nach der Aussaat in Pflanztöpfe (Durchmesser 10cm) vereinzelt. Das Wachstum erfolgte über die gesamte Dauer in Klima-Schränken (KBW 720, Binder, Tuttlingen Deutschland) in einem 12 Stunden Tag/Nacht-Rhythmus bei 21°C bzw.

16°C und einer relativen Luftfeuchte von 60%. Wenn nicht anders erwähnt, wurden alle Experimente mit sechs bis acht Wochen alten Pflanzen durchgeführt. Das Wachstum der Mutanten war im Vergleich zum Wildtyp etwas verlangsamt (Abbildung 2-2) und um mit physiologisch möglichst vergleichbaren Pflanzen zu arbeiten wurden die Mutanten eine Woche vor den Wildtyp-Pflanzen ausgesät.



Abbildung 2-2: Habitus sechs Wochen alter *Arabidopsis thaliana* Wildtyppflanzen und der PYR/PYL-Rezeptormutanten

A: Die ABA-Rezeptormutanten 12458 wuchsen verglichen mit Col-0 Pflanzen (Wildtyp) verlangsamt. Die Komplementation der 12458 mit einzelnen ABA-Rezeptoren steigerte die Wachstumsgeschwindigkeit nur gering.

B: Auch die 11458-Rezeptormutante sowie die dazugehörigen Komplementationslinien wuchsen verglichen mit Wildtyp-Pflanzen langsamer. Dargestellt ist je eine repräsentative Pflanze.

2.1.1.1 Experimente mit *Arabidopsis thaliana*

Um nähere Einblicke in die Funktion der einzelnen ABA-Rezeptoren sowie deren Regulation auf expressioneller Ebene zu erlangen, wurden verschiedene ABA-Sprühexperimente durchgeführt und im Anschluss mittels der Blender-Methode Schließzellen isoliert.

Es wurde ein Sprüh-Experiment durchgeführt, indem *A. thaliana* Wildtyp-Pflanzen *Columbia 0* mit verschiedenen ABA-Konzentrationen besprüht wurden. Dadurch sollte die Regulation der Rezeptorexpression durch kleinste Änderungen in der ABA-Konzentration selbst untersucht werden. Die Pflanzen wurden mit 0µM (Kontrollen), 50nM, 200nM, 500nM, 5µM und 50µM 2-cis, 4-trans ABA-Lösung (\pm ABA) in vollentsalztem Wasser (kurz VE-H₂O) besprüht. Um die Oberflächenspannung des VE-Wassers zu reduzieren und damit ein sofortiges Abperlen der Lösung von den leicht hydrophoben Arabidopsis Blättern zu verhindern wurde der ABA-Lösung (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) das Detergens Triton X-100 (1:10000 verdünnt,

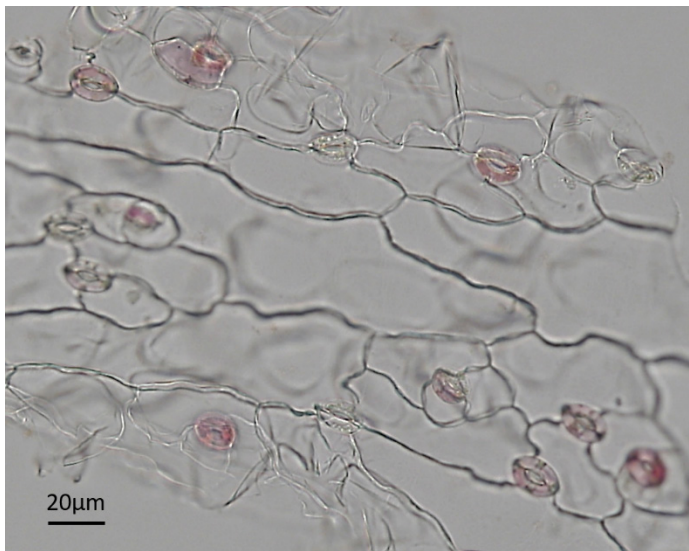


Abbildung 2-3: Epidermisfragment von *Arabidopsis thaliana* Col-0 nach der Schließzell-Aufreinigung durch Mixen

Nach dreimaligem mechanischem Aufschluss des Blattgewebes mit einem Mixer nehmen nur die Schließzellen die Vitalfärbung durch Neutralrot an. Die Epidermiszellen bleiben dagegen farblos.

der Blätter entfernt und die verbliebenen Blattspreiten zusammen mit Eis und VE-Wasser in einen herkömmlichen Standmixer JB 3060 (800W, 24 000 U/min, Braun, Kronberg im Taunus) gegeben. Das Blattmaterial wurde für 1 Minute bei voller Leistung gemixt und anschließend durch ein Sieb (Maschengröße 210 μm) filtriert. Das im Sieb verbliebene Material wurde zwei weitere Male mit Eis und VE-Wasser für 1 Minute gemixt und gefiltert. Nach dem dritten Mal mixen, wurden die Epidermisfragmente mit einem kleinen Spatel aus dem Sieb entfernt und in ein 1,5ml Reaktionsgefäß überführt. Durch Neutralrotfärbung wurde der Reinheitsgrad der Schließzellen in den Epidermisfragmenten bestimmt (Abbildung 2-3). Die Proben wurden sofort in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bis zur weiteren Bearbeitung (siehe 2.5.2) bei -80°C aufbewahrt. Das Experiment wurde vier Mal wiederholt und die Ergebnisse für eine größere statistische Aussagekraft vereinigt.

In einem anderen Sprühexperiment sollte die Rolle der einzelnen, in Schließzellen exprimierten ABA-Rezeptoren an der ABA-regulierten Expression bestimmter Gene untersucht werden. Dafür wurden sowohl *Arabidopsis* Wildtyp-Pflanzen (Ökotyp Col-0) als auch die verschiedenen Rezeptormutanten (Abbildung 2-1) wie oben beschrieben mit $50\mu\text{M} \pm$ ABA-Lösung besprüht. Nach 4h Inkubation wurden auch von diesen Pflanzen Schließzellproben mittels der Mixer-Methode (siehe oben) gewonnen. Das Experiment wurde für eine größere statistische Aussagekraft mehrfach durchgeführt und die Ergebnisse zusammengefasst.

AppliChem, Darmstadt) zugegeben. Je Konzentrationsstufe wurden fünf Pflanzen mit der Lösung besprüht, sodass sowohl die Blattober- als auch die Blattunterseiten vollständig benetzt waren. Nach vier Stunden Inkubationszeit wurden Schließzellproben gewonnen. Die Methode der Anreicherung mittels Mixen beruht darauf, dass die Schließzellen aufgrund verstärkter Zellwände eine höhere Stabilität aufweisen als Epidermis- und Mesophyllzellen und daher schwerer mechanisch zu zerstören sind. Da auch die Zellwände der Leitgewebe eine hohe Stabilität aufweisen, wurden die Mittelrippen

2.1.2 Anzucht von *Chenopodium quinoa*

Um die Funktion der Blasenhaare an der Salztoleranz von *Chenopodium quinoa* zu untersuchen wurden alle Experimente mit dem Kultivar 5020 durchgeführt. Die Pflanzen wurden im Gewächshaus bei einem Tag/Nacht Rhythmus von 12h und einer relativen Luftfeuchte von $50 \pm 5\%$ in normaler Pflanz Erde (Einheitserde CL T, Einheitserdwerke Patzer, Sinntal) aufgezogen. Die Salzbehandlung erfolgte ab einem Alter von vier Wochen mittels NaCl-haltigem Gießwassers. Dabei wurde die Salzkonzentration schrittweise in 50mM Schritten bis zu einer Endkonzentration von 200mM erhöht um eine Adaption der Pflanzen zu ermöglichen. Die Pflanzen wurden etwa alle zwei Tage oder nach Bedarf gewässert. Die Kontrollpflanzen erhielten dieselbe Menge Leitungswasser.

Die Probennahme für die flammenphotometrische Bestimmung der Natrium- bzw. Kaliumaufnahme (siehe 2.2.1) sowie für die RNA-Isolierung für qPCR (siehe 2.5.2) und mRNA-Sequenzierung (siehe 2.5.4) wurde, wenn nicht anders erwähnt, an acht bis zehn Wochen alten Pflanzen durchgeführt.

2.1.3 Anzucht von *Phoenix dactylifera*

An Dattelpalmen wurden die stomatäre Anpassung an extreme Standorte sowie die Adaption auf expressioneller Ebene speziell an Salzstress untersucht.

2.1.3.1 Anzucht für die Experimente zur Stomaphysiologie

Da der Wasserhaushalt der Pflanzen maßgeblich durch Stoma reguliert wird, wurde die Transpiration an jungen, photosynthetisch aktiven Fiederblättern untersucht (Abbildung 2-5 Fiederblatt 2). Die dafür verwendeten zweijährigen Dattelpalmen („Der Palmenmann“, Bottrop) wurden im Gewächshaus in Töpfen (12l Volumen) in einem Erde- (Einheitserde T, Einheitserdwerke Patzer) und Kiesgemisch (70%/30%) kultiviert. Für eine bessere Vergleichbarkeit der Messungen wurden die Wachstumsbedingungen mit einem Tag/Nacht-Rhythmus von 12h und 22°C bzw. 16°C und $50 \pm 5\%$ relativer Luftfeuchte (rH) denen von *Arabidopsis* (siehe 2.1.1) angepasst. Außerdem sollten die Bedingungen möglichst stressarm für die Pflanzen sein. Daher wurden die Dattelpalmen mit $400\mu\text{Mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ für eine optimale Photosyntheseleistung stärker beleuchtet als *Arabidopsis*.

2.1.3.2 Anzucht für die Salzstress-Experimente

Um die physiologischen Grundlagen der Adaption von Dattelpalmen an Salzstress besser zu verstehen, wurde sowohl die Aufnahme und Lokalisation von Na^+ in die Pflanzen mit dem Flammenphotometer als auch die expressionelle Anpassung mittels qPCR untersucht. Die Salzstress-Experimente wurden mit dem Kultivar *Khalas* durchgeführt. Die Pflanzen wurden

bei einem kommerziellen Händler („Date Palm Developers“, Glastonbury UK) mit einer Höhe von ca. 20cm gekauft. Sie wurden ebenfalls in ein Gemisch aus Erde und Kies überführt (siehe 2.1.3) und im Gewächshaus weiter angezogen. Um realistische Stressbedingungen zu simulieren wurden sie mit einem Tag/Nacht-Rhythmus von 16h/8h bei $35 \pm 2^\circ\text{C}$ und $50 \pm 5\%$ relativer Luftfeuchte angezogen. Die Pflanzen wurden für sechs Wochen alle zwei Tage mit 600mM NaCl-Lösung gegossen wobei die Salzkonzentration über eine Woche schrittweise erhöht wurde, um den Pflanzen eine Akklimatisierung zu erlauben. Die Konzentration von 600mM entspricht in etwa der Konzentration von NaCl im Meerwasser und wurde dem nativen Habitat von Dattelpalmen in direkter Küstennähe angepasst (Yaish und Kumar 2015). Die Kontrollpflanzen wurden entsprechend mit Leitungswasser gegossen

2.2 Flammenphotometrie

Um die Mechanismen der Salztoleranz der beiden Nutzpflanzen *Chenopodium quinoa* und *Phoenix dactylifera* vergleichen zu können wurde mit Hilfe der Flammenphotometrie die Aufnahme und Lokalisation von Natrium-Ionen in den Pflanzen bestimmt. Zudem wurde untersucht in wieweit die Salzbehandlung Einfluss auf den Kaliumgehalt und die Kaliumlokalisation hatte.

Die Flammenphotometrie ist eine langjährig eingesetzte Methode zur Konzentrationsbestimmung von Alkalimetallen in Lösung. Alkalimetalle haben die Eigenschaft, dass ihre Elektronen durch extern zugeführte Energie (in Form einer Flamme) angeregt werden können. Bei der Rückkehr auf das ursprüngliche Energieniveau geben die Elektronen elektromagnetische Strahlung ab. Im Fall von Alkalimetallen liegen die Wellenlängen der abgegebenen Strahlung im Bereich von sichtbarem Licht (zwischen 589nm für Natrium und 766nm für Kalium) wodurch sich die Flammenfarbe ändert (MacIntyre 1961). Über für die Elemente spezifische, monochromatische Filter wird das Licht auf Detektoren gelenkt und kann dort gemessen werden. Durch die Messung von geeigneten Standard-Reihen kann die Konzentration der Ionen in Lösung berechnet werden.

Bei dem verwendeten Flammenphotometer handelte es sich um ein Einzelkanalemissions-Flammenphotometer (Modell PFP7, Jenway, Saffordshire UK) mit je einem Kanal für Kalium und Natrium. Über einen Schlauch wird die Probe durch Druckluft in eine Zerstäuberkammer geleitet und dort in eine Flamme zerstäubt. Abhängig von dem zu messenden Ion wird das von der Flamme emittierte Licht durch den jeweiligen Kanal geleitet und gemessen. Allerdings ist die Änderung des emittierten Lichts der Flamme nur in einem sehr niedrigen Konzentrationsbereich der Ionen direkt proportional zur Konzentration des jeweiligen Ions und damit der Zusammenhang zwischen emittiertem Licht und Messwert linear. Dieser direkt proportionale Bereich liegt für Natrium und Kalium unterhalb von 10ppm.

2.2.1 Flammenphotometrische Messungen an *C. quinoa*

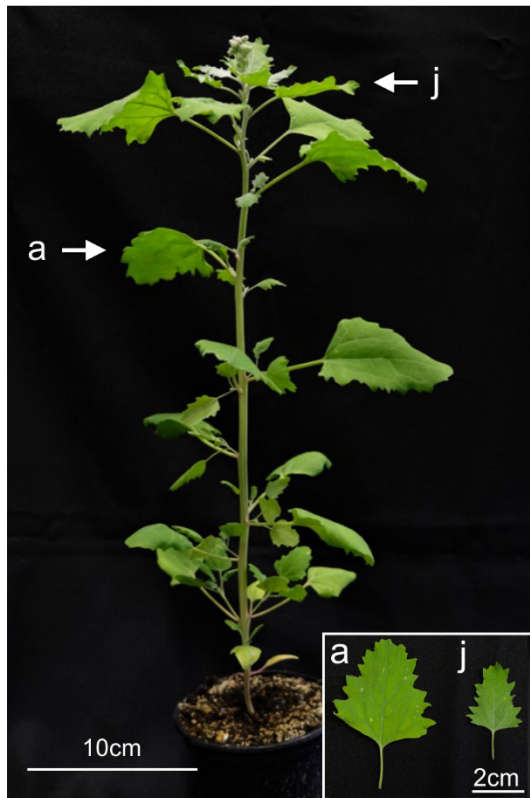


Abbildung 2-4: Habitus einer adulten *Chenopodium quinoa* Pflanze

Eine sieben Wochen alte *C. quinoa* Pflanze, die im Gewächshaus unter Kontrollbedingungen angezogen wurde. Das Inlay zeigt exemplarisch ein adultes (a) und juveniles (j) Blatt, wie sie für die Messungen verwendet wurden.

Um zu überprüfen, ob die salzbehandelten Quinoa Pflanzen, das mit dem Gießwasser zugeführte Natrium aufgenommen haben und in welchen Geweben dieses Natrium vorkommt und möglicherweise akkumuliert, wurden Blattproben (B) sowie EBCs und Blattproben ohne Blaszellen (B – EBC) von Kontrollpflanzen sowie 200mM NaCl behandelten gewonnen (Details zur Pflanzenaufzucht siehe 2.1.2). Um genauere Einblicke in die Rolle der Blaszellen an der Salztoleranz von *C. quinoa* zu erlangen wurde bei den Blattproben sowie den Blattproben ohne EBCs außerdem zwischen juvenilen (juv.) und adulten Blättern unterschieden (Abbildung 2-4), da die Dichte und Intaktheit der Blaszellen auf der Blattoberfläche mit zunehmendem Blattalter stark abnimmt (Bonales-Alatorre et al. 2013). Insgesamt wurden fünf Pflanzen beprobt.

Direkt nach der Ernte wurde das Frischgewicht (FG) aller Proben bestimmt. Um EBCs zu gewinnen, wurden die Blaszellen juveniler Blätter (Abbildung 2-4) mit einem Spatel entfernt. Je Probe wurden ca. 10mg Blaszellen

gesammelt. Für die Blattproben ohne Blaszellen wurden ebenfalls von sowohl juvenilen als auch adulten Blättern die Blaszellen unmittelbar vor der Ernte mittels eines Spatels entfernt. Das Pflanzenmaterial wurde für ca. zwei Tage bei 60°C getrocknet und das Trockengewicht (TG) bestimmt. Nachdem das Material fein gemörsert war, wurden wenn vorhanden jeweils 50mg für den Säureaufschluss eingesetzt, wenn nicht wurde die Menge Salpetersäure dem Pflanzenmaterial angepasst (Hunt 1982). Auf 50mg Pflanzenmaterial wurden 5ml 0,5M Salpetersäure gegeben und bei 80°C für 1h inkubiert. Während der Inkubation wurden die Proben einmal geschüttelt (Munns et al. 2010). Abhängig von der Natrium- bzw. Kaliumkonzentration des Gewebes wurden die Proben so verdünnt, dass die Konzentration im linearen Bereich der Messung lag. Jede Probe wurde drei Mal gemessen und die Werte gemittelt. Mithilfe von Standardlösungen wurden die Konzentrationen errechnet und

anschließend auf das Trockengewicht bezogen. Um physiologisch relevante Werte (Konzentrationen im Zytoplasma) zu erhalten und der Wassergehalt des Probenmaterial aus der Differenz von FG und TG bekannt war, wurde die Konzentration von Na⁺ und K⁺ in der flüssigen Fraktion des Gewebes errechnet:

Der Massenanteil w_i von Natrium bzw. Kalium (m_i) am Trockengewicht (m_{TG}) des Pflanzenmaterials ergibt sich aus

$$w_i = \frac{m_i}{m_{TG}}$$

FORMEL 1

und die Wassermasse m_{H_2O} des Pflanzenmaterials aus der Differenz der Masse des FG und TG

$$m_{H_2O} = m_{FG} - m_{TG}$$

FORMEL 2

Der Massenanteil von Natrium bzw. Kalium c_i im Wasseranteil des Pflanzengewebes entspricht daher

$$w_i = \frac{m_i}{m_{H_2O}}$$

FORMEL 3

Über das Molekulargewicht M_i kann so die Konzentration in der flüssigen Fraktion des Pflanzengewebes errechnet werden

$$c_i = \frac{M_i * m_i}{m_{H_2O}}$$

FORMEL 4

Die so errechneten Konzentrationen wurden mit reellen Messwerten von Presssaft-Proben aus adulten sowie juvenilen Blättern verglichen. Dafür wurde jeweils ein Blatt in einem Reaktionsgefäß mit einem Pistill gründlich ausgepresst. Die Blätter wurden mehrfach eingefroren und anschließend aufgetaut um das Gewebe zusätzlich zu lysieren. Um Zelltrümmer und andere Schwebstoffe zu entfernen wurden die Proben 10min bei 4000rcf zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Der Presssaft wurde für die Messungen ebenfalls entsprechend verdünnt und über Standardlösungen die Konzentration errechnet.

Das Experiment wurde zwei mal mit vergleichbaren Ergebnissen durchgeführt, wobei hier die Ergebnisse eines Experimentes exemplarisch dargestellt sind.

2.2.2 Flammenphotometrische Messungen an *P. dactylifera*

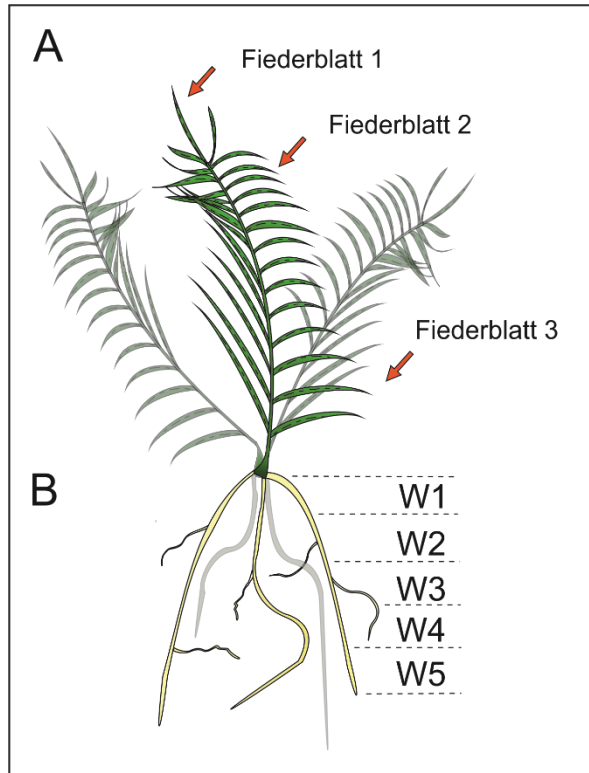


Abbildung 2-5: Schematische Darstellung einer Dattelpalme (*Phoenix dactylifera*).

A: Fiederblatt 1, 2 und 3 wurden sowohl von einem adulten als auch einem juvenilen Palmwedel beprobt (rote Pfeile). B: Die Wurzeln wurden in fünf gleich lange Abschnitte unterteilt (W1-5).

Das Pflanzenmaterial wurde wie für Quinoa beschrieben getrocknet, gemörsert und anschließend mit Salpetersäure aufgeschlossen (siehe 2.2.1). Jede Probe wurde drei Mal gemessen und die Werte gemittelt. Über die Messung von Standardlösungen wurde die Konzentration errechnet und anschließend auf das Trockengewicht bezogen. Das Experiment wurde zwei Mal mit vergleichbaren Ergebnissen durchgeführt und es werden repräsentative Ergebnisse eines Experimentes gezeigt. Zusätzlich wurden für qPCR-Messungen unmittelbar nach der Ernte Teilstücke aller geernteten Wurzelabschnitte in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Bearbeitung bei -80°C gelagert (siehe 2.5.2-2.5.6).

Um Einblicke in die Mechanismen der Salztoleranz der mehrjährigen Dattelpalme zu erlangen wurde die Natriumaufnahme sowie der Einfluss von NaCl-Behandlung auf die Kaliumkonzentration sowohl in Wurzel- als auch in Blattproben von sechs Wochen lang mit 600mM NaCl-Lösung gegossenen Dattelpalmen untersucht (siehe 2.1.3.2). Es wurden Proben von je fünf Kontrollpflanzen und fünf salzbehandelten Pflanzen genommen. Auch bei der Dattelpalme wurde zwischen juvenilen und adulten Blättern unterschieden. Je Pflanze wurden drei Fiederblätter eines adulten und eines juvenilen Palmwedels beprobt (Abbildung 2-5, A). Um eine Akkumulation von Natrium bzw. eine aktive Ausscheidung des Natriums aus dem Wurzelgewebe festzustellen wurden für die Wurzelproben vital wirkende, junge, ca. 50cm lange Wurzeln verwendet, die in fünf gleich

2.3 Blattgaswechsellmessungen

Bei der Messung des Blattgaswechsels von Pflanzen wird der Austausch von CO_2 und dem damit einhergehenden Verlust von Wasser durch Transpiration bestimmt. Da je nach Pflanzenart und der Beschaffenheit der Kutikula nur ca. 2 bis 29% des verlorenen Wassers der Blätter über die Blattoberfläche verdunstet und der größte Teil des Gasaustauschs der Blätter durch die Spaltöffnungen stattfindet (Holmgren et al. 1965; Boyer et al. 1997), kann über die Transpirationsrate indirekt auf die Stomaöffnungsweite geschlossen werden.

2.3.1 Messprinzip

Bei der hier verwendeten, im Institut selbst entwickelten Gaswechsellanlage handelt es sich wie bei den meisten käuflich erwerblichen, tragbaren Systemen um ein so genanntes offenes System. Dabei werden ganze Pflanzen bzw. einzelne Blätter in einer luftdichten, temperierten Küvette platziert, durch welche kontinuierlich Luft mit konstantem CO_2 und H_2O -Gehalt strömt. Um die Transpirationsrate sowie die CO_2 -Aufnahme bzw. Abgabe der Blätter zu messen wird die Luft anschließend durch Infrarot-Gasanalytoren (IRGAs) geleitet. Diese messen die Konzentration von CO_2 und Wasser (in Form von Wasserdampf) in Gasgemischen. Grundlage dieser Messmethode ist das Phänomen, dass CO_2 und H_2O , als so genannte heteroatomische Moleküle, Rotlicht eines spezifischen Spektrums absorbieren (Hunt 2003). Die Infrarotstrahlung wird durch ein System von Linsen, Filtern und Spiegeln durch ein Gasgemisch in einer Messkammer gelenkt, dort gebündelt und schließlich auf Detektoren gelenkt.

Die in der Gaswechsellanlage verbauten differentiellen IRGAs LI 7000 (LiCor, Lincoln; Nebraska, USA) messen Konzentrationsunterschiede von CO_2 und Wasser zwischen einem zu messenden Gasgemisch und einem Referenzgasgemisch. Dafür werden der Referenzgasstrom und der zu messende Küvettenstrom vor Eintritt in die Pflanzenküvetten getrennt und in zwei separaten Infrarot-Messzellen parallel gemessen. Die CO_2 -Konzentration des Luftstroms wird durch eine kontrollierte Zugabe eines CO_2/N_2 -Gasgemisches in den Luftstrom eingestellt. Da die Luft vor Eintritt in das System durch CO_2 -Absorptionsmittel (Soda Lime, Sigma-Aldrich) vollständig von CO_2 befreit wird, kann jede CO_2 -Konzentration höher als ppm CO_2 eingestellt werden.

Die H_2O -Konzentration wird mittels einer Kühlfalle (Kühlfalle KF-18/2B, Walz, Effeltrich) kontrolliert. Der Luftstrom wird zunächst bei Raumtemperatur durch eine Waschflasche mit Fritte geleitet, in der sich Wasser befindet. Dadurch wird die Luft des Luftstroms wassergesättigt, die relative Luftfeuchte entspricht damit 100%. Abhängig von ihrer Temperatur, kann Luft nur eine bestimmte Menge an Wasser (in Form von Wasserdampf)

aufnehmen. Je geringer die Lufttemperatur ist, desto geringer ist Menge an Wasserdampf die gehalten werden kann. Ist die Luft wasserdampfgesättigt entspricht dies dem Sättigungsdampfdruck welcher nach der Magnus-Formel (Formel 5; t = Temperatur in °C) berechnet werden kann und nur von der Lufttemperatur abhängig ist:

$$E_w(t) = 6,112 \text{hPa} a^{\frac{17,62 \cdot t}{243,12^\circ\text{C} + t}}$$

FORMEL 5

Wasserdampfgesättigte Luft bei einer Temperatur von 20°C hat demnach einen Sättigungsdampfdruck von 23.33 hPa. Daraus ergibt sich für eine relative Luftfeuchtigkeit (rH) anteilig ein Dampfdruck E_{rH} von

$$E_{rH} = E_w(t) * \frac{rH}{100\%}$$

FORMEL 6

Durch umstellen der Magnus-Formel (Formel 5) kann nun die Taupunkttemperatur (T_p) für Luft mit diesem Wasserdampfdruck errechnet werden:

$$T_p = 243,12^\circ\text{C} * \left[17,62 * (\ln \frac{E_{rH}}{6,112})^{-1} - 1 \right]^{-1}$$

FORMEL 7

Mittels einer Kühlfalle kann so wasserdampfgesättigte Luft auf den errechneten T_p gekühlt werden wodurch überschüssiges Wasser auskondensiert und durch anschließendes Erwärmen des Luftstroms auf die Messtemperatur kann so die gewünschte rH eingestellt werden. Bei einer Messtemperatur von 20°C und einer gewünschten Luftfeuchte von 52.5% rH entspricht die T_p 10°C. Einzelheiten der Luftflüsse in der Gaswechselanlage sind im Stömungsdiagramm (Abbildung 2-6) dargestellt.

Die Lichtintensität kann über flexible Glasfaser-Lichtleiter (Einarmig M-PVC, Durchmesser 15mm/1000mm, Schott Puravis, Mainz), welche das Licht von stufenlos regelbaren Kaltlichtquellen (Cree XLamp CXA2520 LED für geringe Lichtintensitäten bzw. Cree XLamp CXA2530 LED für hohe Lichtintensitäten) direkt auf die Küvetten lenkt, reguliert werden. Um die Messtemperatur zu regulieren und Temperaturschwankungen durch unterschiedlich starke Beleuchtung der Pflanzen bzw. unterschiedliche Raumtemperaturen in den Küvetten zu vermeiden, sind die Küvetten wassergekühlt.

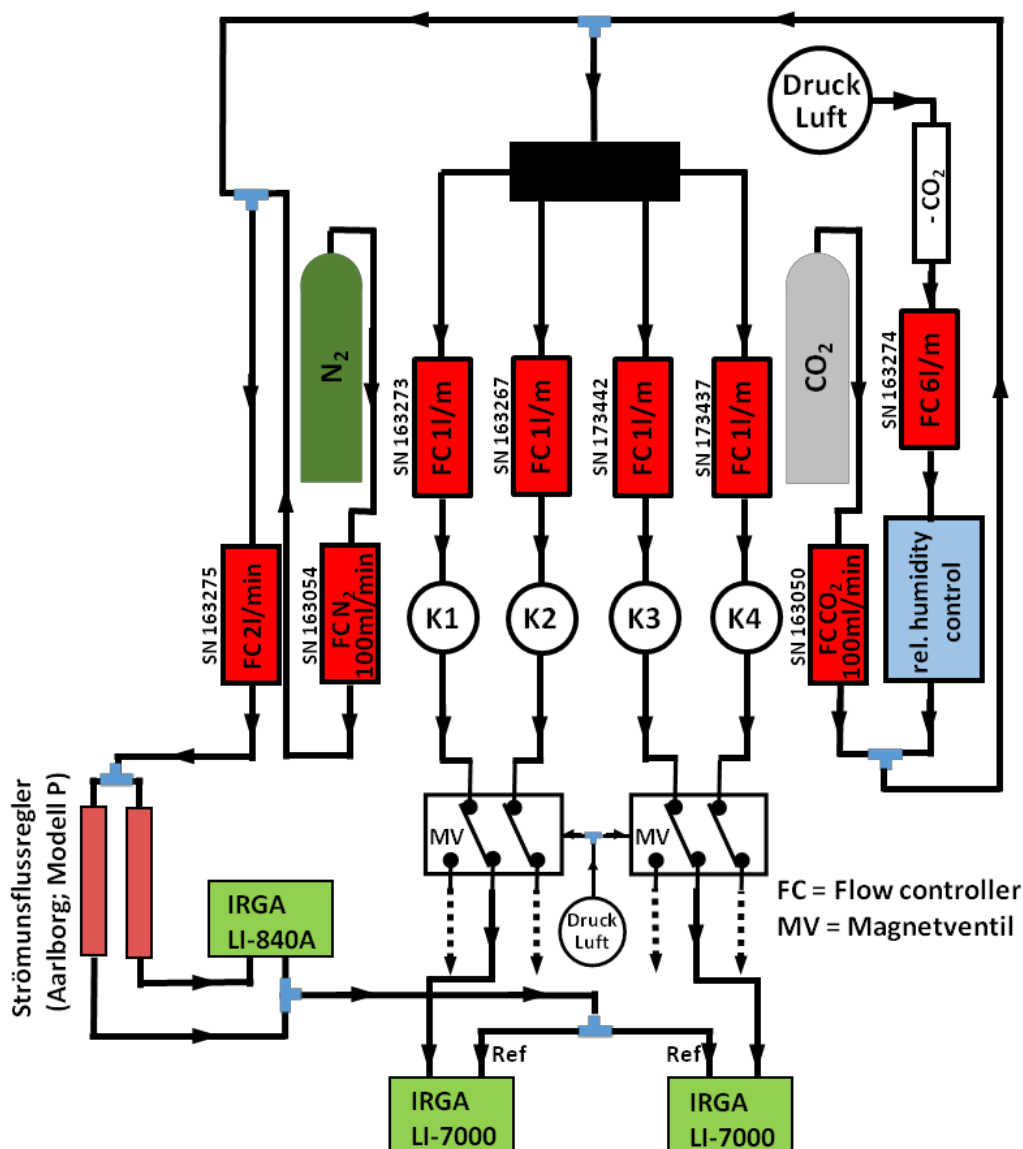


Abbildung 2-6: Schematische Darstellung der Gasflüsse in der eigens konstruierten Gaswechsellanlage. Die Druckluft wird durch CO₂-Absorptionsmittel (Soda Lime) in einen Hauptflussregler (FC, maximal 6l/min) geleitet und auf eine Fließgeschwindigkeit von 6l/min eingestellt. Ein kleinerer Flussregler (FC, maximal 100ml/min) kontrolliert die CO₂-Konzentration der Luft über die Zugabe eines CO₂/N₂-Gasgemisches. Vier weitere Flussregler teilen die Luft in vier gleiche Luftströme zu je 1l/min, die durch die vier Messküvetten (K1-K4) gelenkt werden während 2l/min als Referenzstrom in die beiden differentiellen IRGAs (LI-7000) gelenkt werden (je 1l/min). Die CO₂- und Wasserkonzentration des Referenzluftstroms wird durch einen dritten IRGA (LI-840A) bestimmt durch welchen ein Teil der Referenzluft geleitet wird. Der Referenzstrom wird dafür durch zwei manuelle Strömungsflussregler (Aarborg, Modell P) zu gleichen Teilen aufgeteilt (je 1l/min) und nach der Bestimmung der Wasser bzw. CO₂-Konzentration erneut zusammengeführt bevor er in die Referenzkammern der differentiellen IRGAs geleitet wird. Da die IRGAs des Typs LI-7000 nur jeweils eine Messkammer verbaut haben, wird der Messstrom aus je zwei der vier Pflanzenküvetten abgelesen. Durch zwei druckluftbetriebene Magnetventile (MV) wird zwischen jeweils zwei Küvetten in zeitlichen Intervallen von 1min gewechselt, so dass vier Küvetten parallel gemessen werden können. Die relative Luftfeuchte wird mit Hilfe einer Kühlfalle (rel. Humidity control, Walz KF-18/2B) über den Taupunkt reguliert.

2.3.2 Berechnung verschiedener Photosynthese-Parameter

Die von den IRGAs gemessenen Differenzen zwischen Referenzluftstrom und Küvettenluftstrom im H₂O- und CO₂-Gehalt entstehen durch die Transpiration und die CO₂-Assimilationsrate bzw. die Atmung der jeweiligen Pflanzen in den Küvetten. Anhand der gemessenen Differenzen in den Luftströmen können verschiedene Photosynthese-Parameter errechnet werden:

Die Transpirationsrate E (Einheit: mmol H₂O *m⁻²*s⁻¹) beschreibt die Menge Wasser, die von 1m² Blattfläche in 1s verdunstet. Da die Blätter höherer Pflanzen das meiste Wasser über die Spaltöffnungen verlieren, kann darüber indirekt auf die Stomaöffnungsweite geschlossen werden. Auch die CO₂-Aufnahme bzw. -Abgabe findet hauptsächlich über die Stomata statt und wird als Netto-Assimilationsrate A (Einheit: μmol CO₂*m⁻²*s⁻¹) ausgedrückt.

2.3.3 Gaswechselfmessungen an *Arabidopsis thaliana*

Um die Rolle einzelner ABA-Rezeptoren an der stomatären Antwort auf eine Erhöhung der atmosphärischen CO₂-Konzentration zu untersuchen, wurden Gaswechselfmessungen an intakten *Arabidopsis* Pflanzen durchgeführt. Dazu wurden die Töpfe von fünf bis sieben Wochen alten Pflanzen mit Frischhaltefolie um die Blattrosette herum luftdicht verschlossen um einen Einfluss des Bodens auf die Blattgaswechselfmessung auszuschließen. Die Pflanzen wurden mit dem Topf in die dafür passenden Messküvetten gestellt. Die relative Luftfeuchtigkeit betrug 50 ± 5% bei 20°C Messtemperatur. Zu Beginn der Messungen wurden die Pflanzen 1h dunkeladaptiert und für den Rest der Messung mit 125μE beleuchtet. Nach 1h Lichtadaption und vollständig geöffneten Stomata wurde das CO₂ von 400ppm auf 1000ppm erhöht.

Die Messungen der stomatären Reaktion auf ABA wurden an abgeschnittenen Blättern durchgeführt. Dabei wurden die Blattstiele unter Wasser nachgeschnitten und unmittelbar in Wassergefäße überführt. Um während der Messung Wasserverdunstung aus dem Gefäß zu verhindern, die die Messung der Transpiration beeinflussen würde, wurden die Gefäße mit Deckeln verschlossen, die im Zentrum eine ca. 0,5cm² große Öffnung enthielten, durch welche die Blattstiele in das Wasser gestellt wurden. Aufgrund der stark erhöhten Grundtranspiration der ABA-Rezeptormutanten, welkten die abgeschnittenen Blätter bei Belichtung trotz ausreichender Wasserversorgung in den Gaswechselfküvetten. Um trotzdem die Rolle der einzelnen ABA-Rezeptoren an der stomatären Reaktion auf ABA untersuchen zu können, wurde das bereits von Müller et al. (2017) beschriebene Protokoll wie folgt abgeändert. Die Blätter wurden für 1h im Dunkeln in 50μM ± ABA vorinkubiert und erst anschließend mit 125μE beleuchtet. Auch bei diesen Messungen betrug die rH 50 ± 5% bei 20°C und die CO₂-

Konzentration wurde auf 400ppm eingestellt. Es wurde also der Effekt von über die Petiole appliziertem ABA auf die lichtinduzierte Öffnungskinetik der Stomata der ABA-Rezeptormutanten gemessen.

2.3.4 Vergleichende Gaswechselfmessungen an *Phoenix dactylifera* und *Arabidopsis thaliana*

Um die stomatäre Anpassung der Dattelpalme an extreme, klimatische Bedingungen zu untersuchen, wurde die stomatäre Reaktion einzelner Fieder auf exogenes ABA sowie verschiedene Lichtintensitäten untersucht und mit dem Verhalten von Arabidopsis Wildtyp-Pflanzen verglichen (Müller et al. 2017). Die Messungen der stomatären ABA-Antwort wurden an abgeschnittenen Blättern durchgeführt. Dabei wurden die Petiolen bzw. Fiederblätter unter Wasser nachgeschnitten, um eventuelle Xylemembolien zu entfernen. Die Arabidopsis Blätter wurden für die gesamte Dauer der Messungen in den Küvetten in ein wassergefülltes Gefäß gestellt wodurch eine ausreichende Flüssigkeitszufuhr gewährleistet wurde (siehe 2.3.3). Auch die Fieder der Dattelpalmen wurden in ein wassergefülltes Gefäß überführt, allerdings waren im Deckel zwei ca. 0,5cm lange, der Form der Fieder angepasste Schlitze. Die Fiederblätter wurden mit der Blattunterseite nach oben durch beide Schlitze gefädelt, sodass die Beleuchtung eine möglichst gleichmäßig auf die Blattfläche fiel.

Die Messbedingungen wurden für Palmen und Arabidopsis-Pflanzen soweit möglich angeglichen. Die Blätter wurden jeweils ca. 1h bis zu einer Stabilisierung der Transpiration im Dunkeln bei $50 \pm 5\%$ rH, 20°C und 400ppm inkubiert. Um die Stomata ausreichend zu öffnen wurde die Lichtintensität allerdings den Wachstumsbedingungen der jeweiligen Art angepasst ($125\mu\text{E}$ für Arabidopsis und $1000\mu\text{E}$ für Dattelpalmen). Nachdem die Transpiration im Licht ein Gleichgewicht erreicht hatte, wurde über einen Schlauch direkt ABA in das Wasserreservoir gegeben (Endkonzentration $50\mu\text{M} \pm \text{ABA}$, Verhältnis 1:1). Das ABA wurde entweder in vollentsalztem Wasser oder gelöst in KNO_3 oder KCl -Lösung (Endkonzentration 5mM) zugegeben. Aufgrund der Größe der Dattelpalmen wurden auch die Messungen der lichtabhängigen Transpirationsraten an abgeschnittenen Fiedern durchgeführt. Um einen Vergleich zwischen Arabidopsis-Pflanzen und Dattelpalmen zu erlauben, wurden auch die Messungen an Arabidopsis mit abgeschnittenen Blättern durchgeführt. Die Messbedingungen waren identisch mit denen der ABA Messungen (siehe oben). Nur die Lichtintensität wurde ausgehend von Dunkelheit schrittweise bis auf $1250\mu\text{E}$ erhöht (Müller et al. 2017).

2.4 Chlorophyllfluoreszenzmessungen

Um die Fließgeschwindigkeit von über die Petiole aufgenommenen Substanzen im Leitgewebe in Arabidopsis und Dattelpalmen zu untersuchen wurde die Inhibition des Photosystems II durch 3-(3,4-Dichlorphenyl)-1,1-dimethylharnstoff (DCMU) mittels Chlorophyllfluoreszenzmessungen bestimmt, welches mit einer Endkonzentration von 50µM über die Petiole verabreicht wurde. Die Änderung der Fluoreszenz (F) wurde mit einer Imaging-PAM (Walz, Effeltrich, Germany) bei einer Belichtungsstärke von 125µE für Arabidopsis und 1000µE für *P. dactylifera* gemessen. Die Fließgeschwindigkeit des DCMU wurde über die Dauer der Änderung der Fluoreszenz zwischen zwei Punkten errechnet (Müller et al. 2017). Für Arabidopsis wurde die Messung an neun, für Dattelpalmen an zehn unabhängigen Blättern bzw. Fiederblättern durchgeführt.

2.5 Molekularbiologische Methoden

Abiotischer Stress wie Trockenstress oder Salzstress führt in Pflanzen auch zu einer Anpassung auf genexpressioneller Ebene. Um Einblicke in die expressionelle Adaption an Stressbedingungen zu gewinnen, wurden diese mit Hilfe der quantitativen Echtzeit-Polymerase Kettenreaktion (englisch: *real time quantitative polymerase chain reaction*, kurz: qPCR) untersucht.

2.5.1 Prinzip und Zielsetzung der qPCR

Bei der Polymerasekettenreaktion (kurz: PCR) wird DNA sequenzspezifisch mit Hilfe von DNA-Polymerasen vervielfältigt. Ausgangspunkt für die Amplifikation sind dabei Primer-Paare, die an komplementäre DNA-Stränge binden. Diese Methode der sequenzspezifischen DNA-Amplifikation wurde bereits 1986 von Kary Banks Mullis und Kollegen etabliert (Mullis et al. 1986).

Die quantitative Echtzeit PCR (kurz: qPCR) ist eine Form der DNA-Amplifikation durch eine PCR, in der fluoreszierende Reporterfarbstoffe zur Detektion von DNA eingesetzt werden. Als *Template*-DNA dient dabei cDNA (englisch *copy DNA*), welche bei der reversen Transkription von mRNA (englisch: *messenger RNA*) synthetisiert wird (Pfaffel 2004). Aufgrund der Verwendung von cDNA als Template können Aussagen über die Menge mRNA zum Zeitpunkt der Beprobung getroffen werden. Dabei ist das Fluoreszenzsignal proportional zur Menge der DNA, die in einem PCR-Zyklus gebildet wird (Higuchi et al. 1992).

Grundsätzlich werden bei der qPCR dieselben zyklischen Temperaturschritte durchgeführt wie bei anderen PCR-Formen: Die DNA wird zunächst denaturiert (bei 95°C) um Sekundärstrukturen und die Doppelstränge zu trennen. Danach wird die Temperatur soweit abgesenkt, dass die jeweiligen Primer spezifisch binden können. Diese Temperatur ist für

einzelne Primer individuell (siehe 2.5.7). Anschließend wird die Temperatur der optimalen Arbeitstemperatur der DNA-Polymerase angepasst (Taq-Polymerase 72°C) und die DNA wird amplifiziert, wobei es durch den Einsatz eines Primerpaares für komplementäre DNA-Stränge im Idealfall (bei einer PCR-Effizienz von 100%) zu einer Verdopplung der DNA kommt (Nonis et al. 2011). Diese Schritte werden typischerweise in 30-45 Zyklen wiederholt. Durch jeden neu gebildeten DNA-Doppelstrang steigt die Fluoreszenz des Farbstoffes an. Dabei hängt die Geschwindigkeit der Zunahme des Fluoreszenzsignals von der anfänglichen Transkriptmenge ab. Der Zyklus, bei dem die Fluoreszenz das Hintergrundsignal überschreitet und in die exponentielle Wachstumsphase eintritt, wird *Threshold-Cycle* (C_t) genannt (Nolan et al. 2006). Die Bestimmung des C_t eines Gentranskripts in Bezug zu zum C_t eines unabhängig von Gewebe, Entwicklungsstadium und externen Faktoren konstitutiv exprimierten Haushaltsgens (englisch: *housekeeping gene*) erlaubt schließlich quantitative Aussagen über die Expression eines bestimmten Gens. Voraussetzung für die Reproduzierbarkeit der qPCR sind undegradierete, DNA freie mRNA, eine vollständige reverse Transkription der mRNAs in einzelsträngige cDNA und eine Anpassung der PCR-Bedingungen (Pfaffel 2004). Im Folgenden werden diese Schritte nacheinander erörtert.

2.5.2 RNA Isolation aus pflanzlichem Gewebe

Da bei der cDNA-Synthese (siehe 2.5.5) mRNA als Template dient, musste zunächst RNA aus pflanzlichem Gewebe isoliert werden. Sämtliches Pflanzenmaterial wurde vor der RNA-Extraktion gemörsert. Im Fall von Blatt- und Schließzellproben wurde das Pflanzenmaterial in 1,5ml Reaktionsgefäße mit jeweils 2 Stahlkugeln (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) überführt und mit einer Kugelmühle (TissueLyzer II, Quiagen, Hilden, Deutschland) unter Kühlung mit flüssigem Stickstoff gemörsert. Nur die Wurzelproben der Dattelpalmen (siehe 2.2.2) wurden von Hand in einem Mörser zu feinem Pulver zerrieben. Auch hierbei wurde auf eine permanente Kühlung mit flüssigem Stickstoff geachtet, da RNA aufgrund von ubiquitär vorkommenden RNAsen sehr schnell degradiert wird. Degradierete RNA würde bei der RT (siehe 2.5.5) und später der qPCR zu Problemen führen (Pfaffel 2004).

Die Gesamt-RNA aller Proben wurde mit Hilfe des Silicamembran-basierten NucleoSpin® RNA Plant Kits (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) extrahiert. Aufgrund der sekundären Pflanzenstoffe und dem hohen Polysaccharidgehalt von Pflanzen, welche die Bindung der RNA an die im Kit enthaltenen Säulchen stören könnte, wurden maximal 100mg Pflanzenmaterial für die RNA-Isolierung eingesetzt. Da sämtliche Schritte der RNA-Extraktion bei Raumtemperatur durchgeführt wurden, wurde dem Lysis-Puffer (RA1) Tris-(2-carboxyethyl)-phosphin (kurz TCEP, Sigma-Aldrich) im Verhältnis 1:100 zugegeben. TCEP ist

stark reduzierend und denaturiert Disulfid-Brücken von Proteinen (Burns et al. 1991) wodurch die Aktivität der vorhandenen RNAsen inhibiert wird.

Die gesamte Durchführung der RNA-Extraktion erfolgte nach Herstellerangaben mit den im Kit enthaltenen Waschpuffern RAW2 und RA3. Bei der Extraktion der RNA aus Dattelpalmengewebe wurde allerdings vom Herstellerprotokoll abgewichen. Da dieses Gewebe besonders viele Polysaccharide und Polyphenole enthält, wurde das gemörserte, gefrorene Pflanzenmaterial vor der Extraktion mit 500µl Fruit-Mate (TaKaRa, Kusatsu, Präfektur Shiga, Japan) vermischt und anschließend bei 4°C und 21000rcf für 5min zentrifugiert. Fruit-Mate ist ein Reagenz, welches nichtionische Polymere enthält, die Polysaccharide und Polyphenole bindet. Außerdem wurde bei der Extraktion der RNA aus Quinoa EBCs vom Herstellerprotokoll abgewichen. Die EBCs wurden mit einem Spatel direkt in den Lysis-Puffer RA1 gekratzt. Deshalb wurden 500µl (statt 350µl) RA1-Puffer verwendet und die Menge des 70% Ethanols entsprechend angepasst. Die Eluation der an die Silicamembran gebundenen RNA erfolgte mit 30µl 0,1% Diethyldicarbonat-Wasser (kurz DEPC-H₂O). Das DEPC-H₂O wurde zweimal für 1min auf der Membran inkubiert. Anschließend wurde die Konzentration der gewonnenen RNA mit dem Nanodrop2000c Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) ermittelt.

2.5.3 DNase-Verdau und RNA-Fällung

Aufgrund der ähnlichen chemischen Eigenschaften von RNA- und DNA-Molekülen enthalten RNA-Isolate häufig geringe Mengen genomischer DNA, die bei der qPCR zu einer Verfälschung der Ergebnisse führen können (Laurell et al. 2012). Deshalb wurde ein DNase-Verdau durchgeführt. Je 2µg Gesamt-RNA wurden mittels der RNase freien DNase I (Thermo Fisher Scientific) in Anwesenheit des RNase-Inhibitors RiboLock (Thermo Fisher Scientific) verdaut. Dabei war das Gesamtvolumen der Reaktionsmische abhängig von der Ausgangskonzentration der RNA, betrug aber nach Herstellerempfehlung mindestens 20µl. Für einen 20µl Reaktionsansatz wurden 2µg RNA, 2µl zehnfach DNase I-Puffer, 1µl DNase (1U/µl) und 0,5µl RNase-Inhibitor (40U/µl) eingesetzt und entsprechend mit DEPC-H₂O aufgefüllt. Der Verdau wurde für 45min bei 37°C inkubiert. Betrug das Gesamtvolumen der Reaktion mehr als 20µl wurden die einzelnen Komponenten entsprechend angepasst.

Da die Komponenten des DNase-Verdaus die reverse Transkription beeinträchtigen können, wurde die RNA im Anschluss mit Isopropanol gefällt und aufkonzentriert. RNA ist ein polares Molekül, welches grundsätzlich gut wasserlöslich ist. In Anwesenheit hoher Konzentrationen monovalenter Kationen wie Ammoniumacetat fällt RNA leicht aus (Martins et al. 2014). Die negative Ladung des Phosphatrückgrates interagiert mit der positiven Ladung der Kationen

wodurch die Polarität des RNA-Moleküls verloren geht. Die Zugabe von Alkohol wie Isopropanol erleichtert dabei die Reaktion (Walker und Lorsch 2013).

Für die RNA-Fällung wurde jeder Reaktionsansatz mit DEPC-H₂O auf 100µl aufgefüllt. Es wurden jeweils 75µl Isopropanol, 10µl 5M Ammoniumacetat in EDTA (Endkonzentration 0,27M) sowie 1µl Glycogen (Thermo Fisher Scientific) über Nacht bei -20°C inkubiert und anschließend bei 4°C und 21000rcf für 1h zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet mit 70% Ethanol für 30min bei 4°C und 21000rcf zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand erneut abgenommen und das RNA-Pellet bei 37°C getrocknet. Die vollständig getrocknete RNA wurde für die folgende reverse Transkription (siehe 2.5.5) in 7µl DEPC-H₂O eluiert.

2.5.4 RNA-Sequenzierung der Quinoa mRNAs

Um den Einfluss der Salzbehandlung auf das Expressionsmuster von Quinoa genauer zu untersuchen, wurden Sequenzierung der mRNAs, der im Rahmen dieser Arbeit gewonnen Gesamt-RNAs der verschiedenen Gewebe, an der *Core Facility for Genomics of the Shanghai Center for Plant Stress Biology* durchgeführt (Böhm*, Messerer*, Müller* et al. 2018). Auch die mRNA-Sequenzierungs-Bibliotheken wurden in Shanghai mittels des NEBNext Ultra Directional RNA Library Prep Kits (New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, Vereinigte Staaten) erstellt und die Sequenzierung mit einem HiSeq2500 durchgeführt.

Die Auswertung der RNA-Sequenzierung wurde von Dr. Maxim Messerer (Plant Genome and Systems Biology, Helmholtz Center Munich) durchgeführt. Eine detaillierte Beschreibung der Sequenzierung sowie der anschließenden Auswertung ist in Böhm*, Messerer*, Müller* et al. 2018 zu finden.

2.5.5 Reverse Transkription der mRNA

Bei der reversen Transkription (kurz RT) von mRNA mit Hilfe von RNA-abhängigen DNA-Polymerasen wird, ausgehend vom 3'-Ende der mRNAs, ein zu der mRNA komplementärer DNA-Strang gebildet. RNA-abhängige DNA-Polymerasen wurden erstmals in Retroviren entdeckt (Temin und Mizutani 1970; Baltimore 1970) und dienen dort der Replikation des viralen Genoms. Heutzutage sind sie in der Molekularbiologie ein grundlegendes Werkzeug.

Eukaryotische mRNAs haben ein polyadenyliertes 3'-Ende. Dieser Bereich wird Poly(A)-Schwanz genannt und dient unter anderem zum Schutz vor Abbau in Zellen (Colgan und Manley 1997). Da bei der RT möglichst alle vorhandenen mRNAs in cDNA transkribiert werden sollen, wird diese Poly(A)-Sequenz als Bindungsstelle für einen Oligo(dT)-Primer verwendet. Dieser Primer dient der RNA-abhängigen DNA-Polymerase als Startpunkt für die Transkription. Je Reaktion wurden 6,7µl der gefällten RNA, 0,5µl Desoxynukleotid-

Triphosphate (dNTPS, 10mM), 0,4µl Oligo(dT)-Primer (100µM) und 2µl Reaktionspuffer (250 mM Tris-HCl (pH 8,3 bei 25°C), 250 mM KCl, 20 mM MgCl₂, 50 mM DTT) eingesetzt. Die RNA wurde für 2min bei 70°C denaturiert und erst dann wurden 0,4µl RT-Enzym (200 U/µl, RevertAid H Minus Reverse Transcriptase, Thermo Fisher Scientific) hinzugegeben und die Reaktion für 1h bei 42°C inkubiert.

Für die endgültige Anwendung der so synthetisierten cDNA, die Messung der Transkriptmengen mittels qPCR, wurde die cDNA 1:20 mit HPLC aufgereinigtem tRNA-H₂O verdünnt. Die tRNA (Endkonzentration 10 nM) dient der Stabilisierung der cDNA-Verdünnung, da sie die Bindung der cDNAs an die Reaktionsgefäße verhindert und zu einer Reduktion der Bildung von Primer-Dimeren führt (Sturzenbaum 1999).

2.5.6 Durchführung und Auswertung der qPCR Messungen

Alle qPCR Messungen wurden mit dem Mastercycler RealPlex (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) in PCR-Platten und einem Reaktionsvolumen von 20µl durchgeführt. Für jede Reaktion wurden 8µl SYBR-Green (ABsolute QPCR SYBR green capillary mix, Thermo Scientific) und 2µl cDNA-Template eingesetzt. Das restliche Volumen wurde mit in HPLC-H₂O gelösten vorwärts- und revers-Primern (kurz: fwd bzw. rev-Primer) aufgefüllt (Endkonzentration je Primer 0,3µM). Das PCR-Programm beinhaltete zu Beginn einen Denaturierungsschritt von 15min sowie eine Schmelzkurvenmessung am Ende. Das standardmäßige 3-Schritt PCR-Programm (siehe 2.5.1) war dabei um einen Schritt erweitert, indem die Messung der Fluoreszenz bei 79°C erfolgte um eventuell vorhandene Primer-Dimere und kleine unspezifische PCR-Produkte, mit niedrigem Schmelzpunkt zu denaturieren. Abschließend wurde durch schrittweise Erhöhung der Temperatur von 79°C bis auf 95°C die Schmelztemperatur des PCR-Produktes ermittelt (Tabelle 2-1) um die Spezifität des Amplikons zu verifizieren.

Um Rückschlüsse auf die tatsächliche Transkriptanzahl eines Gens von Interesse ziehen zu können, wurden für jedes Amplikon Standardreihen hergestellt. Als Ausgangsmaterial für die Standardreihen dienten mit dem DNA-Purification-Kit (Quiagen, Hilden, Deutschland) nach Herstellerangaben aufgereinigte PCR-Produkte, deren Konzentration spektrophotometrisch bestimmt wurde (Nanodrop 200c, Thermo Fisher Scientific). Die Template-DNA wurde ausgehend von der höchsten Konzentration von 10fg/µl in einer 1:10 Verdünnungsreihe bis zur niedrigsten Konzentration von 0,1fg/µl mit tRNA-H₂O verdünnt.

Tabelle 2-1: In dieser Arbeit verwendetes qPCR Programm

Temperatur	Dauer	Funktion	Anzahl
95°C	15min	<i>Denaturierung</i>	Einmalig
95°C	15s	<i>Denaturierung</i>	
T _m	20s	<i>Primer-Annealing</i>	40 Zyklen
72°C	20s	<i>Amplifikation</i>	
79°C		<i>Fluoreszenzmessung</i>	
95°C	5s	<i>Denaturierung</i>	Einmalig
79°C bis 95°C	Xs (0,3°C/s)	<i>Fluoreszenzmessung</i>	Einmalig
40°C	30s	<i>Abkühlen</i>	Einmalig

Die Standards wurden bei allen Messungen mitgemessen und es wurden ebenfalls 2µl für jede Reaktion eingesetzt. Über die Standards konnten die C_t der Messungen in fg DNA umgerechnet werden.

Da die Fragmentlänge der Amplikons und das Gewicht von DNA bekannt war (Giulietti et al. 2001),

$$1\text{fg von } 1000\text{bp DNA} = 910 \text{ Kopien}$$

FORMEL 8

konnte die anfängliche Anzahl der Moleküle in einer PCR-Reaktion berechnet werden. Da die cDNA-Konzentration von Probe zu Probe variiert, wurden alle Ergebnisse auf 10000 Moleküle des jeweiligen Housekeeping Gens bezogen (Anhang 6.1).

2.5.7 Primerdesign

Die für eine qPCR verwendeten Primer müssen bestimmten Anforderungen entsprechen. Die folgenden Grundsätze wurden, soweit möglich für alle selbst designten Primer beachtet.

Die Produktlänge, die durch die Position der Primer bestimmt wird, sollte nicht größer als 500bp und für alle gemessenen Gene eine ähnliche Größe haben, da die Amplikonlänge einen

Einfluss auf die Effizienz der PCR-Reaktion hat. Die Primerlänge sollte idealerweise zwischen 18 und 24bp liegen. Zu kurze Primer sind wenig spezifisch, zu lange Primer mindern die Effizienz der PCR (Thornton und Basu 2011). Außerdem sollte ein Primerpaar ähnliche Annealingtemperaturen aufweisen, sind diese zu unterschiedlich, kann es zu unspezifischen Bindungen oder fehlender Bindung kommen. Da die RT der mRNA (siehe 2.5.5) in 3'-5' Richtung abläuft, wurden die Primer soweit möglich in die Nähe des 3'-Endes gesetzt, um eine Verfälschung der Ergebnisse durch eine unvollständige RT auszuschließen (Udvardi et al. 2008).

Sämtliche verwendeten Primer wurden, wenn nicht anders erwähnt, mit der Oligo7 Primer Analysis Software entworfen (Rychlik 2007) und über die Firma TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH (Berlin, Deutschland) bezogen. Die Spezifität sowie die optimale Annealingtemperatur neu designter Primer wurde mittels Temperaturgradienten-PCR getestet (Bereich der Annealing-Temperatur von 50°C - 63°C) und die PCR-Produkte mittels Schmelzpunkt-Analyse und DNA Agarose-Gelelektrophorese (siehe 2.5.8) überprüft. Zusätzlich wurde das Amplikon nach Sanger sequenziert (GATC Biotech AG, Konstanz).

Alle für Dattelpalmen verwendeten Primer wurden auf bereits veröffentlichte Sequenzen designt und die Zugangsnummern (englisch: *accession No.*) der Sequenzen sind in Anhang A (6.1) aufgeführt und können unter <https://www.ncbi.nlm.nih.gov> abgerufen werden. Die Accession No. der verwendeten Quinoa-Sequenzen sind ebenfalls in Anhang A (6.1) aufgeführt und bei EMBL-EBI (www.ebi.ac.uk/arrayexpress) von Böhm*, Messer*; Müller* et al. 2018 hinterlegt.

2.5.8 DNA Agarose-Gelelektrophorese

Durch die negative Ladung des Zucker-Phosphat-Rückgrats kann DNA bei der Agarose-Gelelektrophorese im elektrischen Feld nach der Fragmentlänge aufgetrennt werden. Kleinere Fragmente wandern dabei schneller in Richtung Pluspol des elektrischen Feldes als größere. Da die Länge der qPCR-Produkte unter 500bp beträgt, wurde ein 3%-iges Agarosegel verwendet, das 0,5µl/100ml des Fluoreszenzfarbstoffes GelGreen (GelGreen Nucleic Acid Stain, Biotium, Hayward, California, USA) enthielt. Durch diesen Farbstoff konnten die DNA-Banden durch die Anregung mit UV-Licht (254-366nm) mittels des Gel-Imagers IX 20 (Intas; Göttingen) sichtbar gemacht werden. Als Größenmarker wurde ein λ-Pst-Marker verwendet.

2.6 Lichtmikroskopie

Alle lichtmikroskopischen Aufnahmen wurden mit einem Durchlicht-Mikroskop BZ8100-E (Keyence, Osaka Japan) aufgenommen.

2.7 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten mittels unabhängigem, zweiseitigem student's t-test unter Berücksichtigung der Varianz erfolgte mit Microsoft Excel (Microsoft, Redmond, Washington, USA) oder OriginPro (OriginLab, Northampton Massachusetts, USA). Auch die graphische Darstellung der Ergebnisse wurde mit diesen Programmen durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1 Die Funktion der PYR/PYL ABA-Rezeptoren in Schließzellen

Ein von Hubert Bauer (Julius von Sachs Institut, Uni Würzburg) durchgeführtes Microarray Experiment ergab erste Hinweise darauf, dass die ABA-Rezeptoren nicht nur an der Schließzell-Reaktion auf ABA, sondern auch an der Reaktion auf die Stomaschluss-Stimuli Dunkelheit, Luftfeuchte und CO₂ beteiligt sind. Bis auf PYL1 war die Expression aller übrigen Rezeptoren in Schließzellen von *Arabidopsis* abhängig von einem oder mehreren dieser Faktoren (Tabelle 3-1). Besonders auffällig dabei war, dass durch jeden einzelnen der Stimuli ein individuelles Set an Rezeptoren reguliert wurde. Durch Dunkelheit beispielsweise wurden die Rezeptoren PYR1, PYL5 und PYL8 induziert, wohingegen durch die Erhöhung des CO₂ lediglich PYL2 reprimiert wurde (Tabelle 3-1 Fc Dunkelheit/Licht und Fc 1000/380). Das Absenken der Luftfeuchte von 80% auf 20% rH führte zur Repression derselben drei Rezeptoren wie die Behandlung mit ABA (Vgl. Tabelle 3-1 Fc ABA/Kontrolle mit Fc 20%/80% rH).

Tabelle 3-1: Änderungen der PYR/PYL Expression in Schließzellen von *Arabidopsis thaliana* in Microarrays durch verschiedene Stomaschluss-Signale

6-7 Wochen alte *Arabidopsis thaliana* Pflanzen wurden mit den Stomaschluss-Stimuli ABA (50µM für 4h), niedriger Luftfeuchtigkeit (20% rH für 4h (Bauer et al. 2013)), Dunkelheit (für 2h) oder 4h mit 1000ppm CO₂ behandelt. Jede Gruppe hatte eigene Kontrollpflanzen, die bei 100µmol*m⁻²*s⁻¹, 380ppm CO₂ und 50% rH inkubiert wurden. Anschließend wurden die Schließzellen mittels der Blender Methode aufgereinigt und die RNA für Microarray Hybridisierung gewonnen. Die Kontrollpflanzen des Luftfeuchte-Experiments wurden für die Dauer des Experiments bei 80%rH gehalten. Dargestellt sind Induktionsfaktoren (englisch: *fold change*, Fc) der sechs in Schließzellen exprimierten ABA-Rezeptoren gegen die jeweiligen Kontrollen (n=4).

Das Experiment wurde von Herrn Hubert Bauer und die Auswertung der Microarray Ergebnisse von Herrn Marcus Dittrich des Institutes für Bioinformatik, Universität Würzburg durchgeführt.

Rezeptor	AGI	Fc			
		ABA/Kontrolle	20/80%rH	Dunkelheit/Licht	1000/380 ppm CO ₂
PYR1	AT4G17870			2.9	
PYL1	AT5G46790				
PYL2	AT2G26040	-2.6	-3.2		-2.2
PYL4	AT2G38310	-2.9	-3.3		
PYL5	AT5G05440	-2.0	-2.4	13.4	
PYL8	AT5G53160			2.2	

Um nun funktionelle Unterschiede der in Schließzellen vorkommenden ABA-Rezeptoren zu identifizieren, wurde die schnelle Reaktion von Schließzellen verschiedener Rezeptor-Mutanten auf unterschiedliche Stomaschluss-Stimuli untersucht.

Die Verfügbarkeit zweier verschiedener Arabidopsis fünffach Verlustmutanten, sowie von schließzellspezifischen Komplementationslinien einzelner Rezeptoren in diesen Linien erlaubten die Untersuchung der Funktion einzelner Rezeptoren ohne, dass deren Funktion von anderen Rezeptoren überlagert wurde (siehe 2.1.1.1). Für die 12458-Verlustmutante (im Folgenden 12458 genannt) wurde bereits gezeigt, dass deren Stomata insensitiv gegenüber verschiedenen externen Stomaschluss-Signalen sind und diese Pflanzen deutlich erhöhte Transpirationsraten aufweisen (Gonzalez-Guzman et al. 2012; Merilo et al. 2013). Um nun die Rolle einzelner Rezeptoren bei der Regulierung der Stomaweite unter normalen, für die Pflanzen stressfreien Bedingungen zu untersuchen, wurde mittels Infrarot-Gasanalyse, die *Steady-State* Transpiration der 12458-Komplementationslinien bei für die Pflanzen normalen Wachstumsbedingungen (400ppm CO₂, 50 ± 5% rH bei 20°C und 125µmol*m⁻²*s⁻¹ Beleuchtungsintensität) bestimmt.

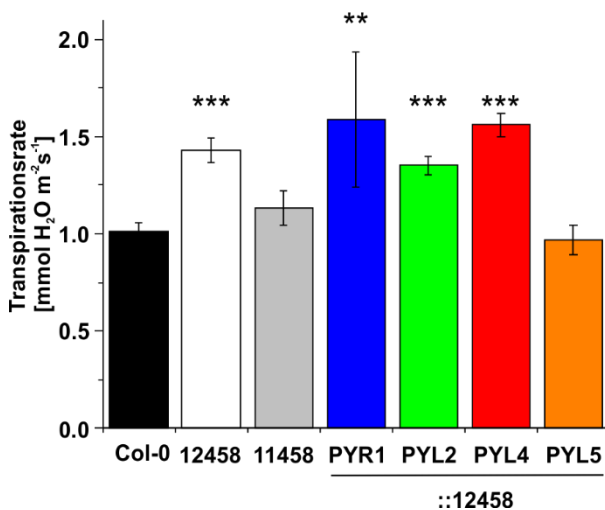


Abbildung 3-1: Steady-State Transpirationsraten der ABA-Rezeptormutanten

Verglichen mit der Transpirationsrate der Wildtyp Pflanzen (Col-0, schwarz) war die Transpiration der 12458 (weiß), sowie der Komplementationslinien PYR1 (blau), PYL2 (grün) und PYL4 (rot) deutlich erhöht, während sich die Transpirationsraten der Komplementationslinien PYL5 (orange) und der 11458-Verlustmutante (grau) nicht von der der Wildtyp-Pflanzen unterschieden. Messwerte wurden an intakten Pflanzen bei 50 ± 5% rH bei 20°C, 400ppm CO₂ und 125µmol*m⁻²*s⁻¹ im Gleichgewichtszustand erhoben. (n ≥ 5, Mw ± SE, signifikante Unterschiede zu Wildtyp-Pflanzen (Col-0) sind markiert als * p ≥ 0,05, ** p ≥ 0,01 und *** p ≥ 0,001)

Die lichtadaptierten Transpirationsraten der 12458-Komplementationslinien mit PYR1, PYL2 und PYL4 waren mit ca. 1,5 mmol H₂O*m⁻²*s⁻¹ rund ein Drittel höher als die der Wildtyp-Pflanzen (Abbildung 3-1 blau, grün und rot) und vergleichbar mit der fünffach Hintergrund-Mutante (Abbildung 3-1 weiß). Nur die Transpiration der PYL5::12458 war mit der des Wildtyps vergleichbar (Abbildung 3-1 orange). Interessanterweise war auch die lichtinduzierte Transpiration der 11458 (PYL2 vorhanden) nur marginal höher als bei Wildtyp-Pflanzen (Abbildung 3-1 grau) was neben PYL5 auch auf eine zentrale Rolle von PYL2 bei der Regulation der Stomaweite hindeutet.

3.1.1 Funktionelle Unterschiede der PYR/PYL-Rezeptoren beim Stomaschluss

Ein Anstieg des ABA-Gehaltes in Schließzellen höherer Landpflanzen führt in der Regel zum Stomaschluss. Ob alle der in Schließzellen von Arabidopsis exprimierten ABA-Rezeptoren gleichermaßen an der Perzeption und der Signaltransduktion des ABA-Signals beteiligt sind, konnte bis dato aufgrund des gleichzeitigen Vorkommens mehrerer PYR/PYL-Rezeptoren in Schließzellen nicht eindeutig geklärt werden. Um Einblicke in die Rolle einzelner Rezeptoren am schnellen Stomaschluss zu gewinnen, wurde die Reaktion der Arabidopsis Rezeptormutanten sowohl auf über die Petiole gefüttertes ABA als auch auf eine Erhöhung des atmosphärischen CO₂-Gehaltes mittels Infrarot-Gasanalyse (IRGA) untersucht.

3.1.1.1 ABA

Die Messung der Änderungen der Transpirationsraten durch ABA-Zugabe in der hier verwendeten Gaswechsellanlage (siehe 2.3.1), wurden an einzelnen, von intakten Pflanzen abgeschnittenen Blättern bestimmt, um das ABA gezielt über die Petiole in den Transpirationsstrom geben zu können. Aufgrund der sehr hohen Transpirationsraten der 12458-Rezeptormutanten (siehe 3.1), welkten deren Blätter trotz ausreichender Wasserversorgung bei Beleuchtung. Um dies zu umgehen wurden bei allen Experimenten die abgeschnittenen Blätter im Dunkeln für eine Stunde mit 50µM ± ABA inkubiert, was bei Wildtyp-Pflanzen zum Stomaschluss führen und die lichtinduzierte Stomaöffnung vollständig unterbinden sollte. ABA-insensitive Mutanten sollten dagegen trotz ABA-Vorinkubation mit der Öffnung der Stomata auf Belichtung reagieren. Die ABA-Vorinkubation verhinderte bei Blättern von Wildtyp-Pflanzen die lichtinduzierte Öffnung der Stomata und damit auch eine Zunahme der Transpiration (Abbildung 3-2 A, schwarze Quadrate). Die beiden fünffach Verlustmutanten unterschieden sich dagegen in ihrer ABA-Sensitivität. Das Fehlen der fünf Rezeptoren PYR1, PYL2, 4, 5 und 8 in der 12458-Verlustmutante (PYL1 vorhanden) resultierte in einem ABA-insensitiven Stomaöffnungs-Phänotyp. Die relative Transpirationsrate dieser Mutante nahm trotz der ABA-Vorinkubation durch die Beleuchtung innerhalb von 30min um ca. 25% zu ohne eine Sättigung zu erreichen (Abbildung 3-2 A, weiße Kreise), wohingegen die fünffach Verlustmutante der ABA-Rezeptoren PYR1, PYL1, 4, 5 und 8 (PYL2 vorhanden) keinen Phänotyp in der Stomaöffnung nach ABA-Vorinkubation aufwies. Das alleinige Vorhandensein des Rezeptors PYL2 in den Schließzellen dieser Mutante reichte demnach aus, um die lichtinduzierte Stomaöffnung durch die vorherige Inkubation mit ABA zu inhibieren (Abbildung 3-1 A, graue Kreise). Da schon die 11458-Verlustmutante keinen Unterschied zum Wildtyp-Verhalten in der ABA-Sensitivität zeigte, wurden im Weiteren nur die Komplementationslinien der 12458 untersucht.

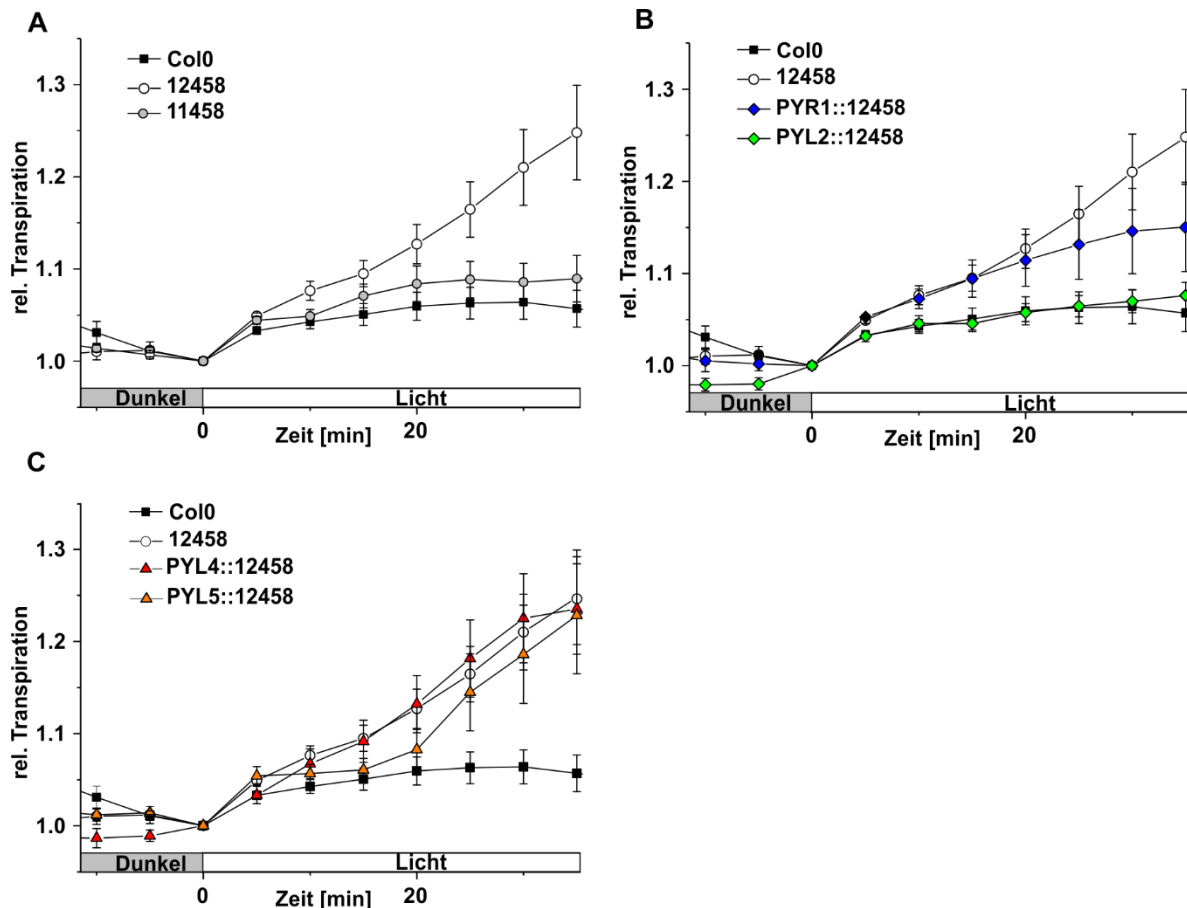


Abbildung 3-2: Auswirkung von ABA auf die lichtinduzierte Stomaöffnung von Arabidopsis ABA-Rezeptormutanten

Abgeschnittene *Arabidopsis thaliana* Blätter wurden bei ausreichender Wasserversorgung über die Petiole für 1h mit $50\mu\text{M} \pm$ ABA im Dunkel (400ppm CO_2 und $50 \pm 5\%$ rH bei 20°C) inkubiert und anschließend mit einer Intensität von $125\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ beleuchtet. Die Transpiration wurde mittels Infrarot-Gasanalyse gemessen und die Werte auf die Transpiration vor Beginn der Beleuchtung bezogen (0min).

Die relative Transpiration der 12458-Verlustmutante (weiße Kreise) nahm innerhalb von 40min auf das 1,3fache zu, wohingegen die 11458-Verlustmutante (graue Kreise) eine mit Wildtyp-Pflanzen (Col-0, schwarze Quadrate) vergleichbare Zunahme der rel. Transpiration zeigte (A). Die Komplementation der 12458-Verlustmutante mit dem ABA-Rezeptor PYR1 (blaue Rauten) stellte die ABA-Sensitivität teilweise wieder her. Die Komplementation der 12458 mit dem ABA-Rezeptor PYL2 (grüne Rauten) führte dagegen zu einer vollständigen Wiederherstellung der ABA-Sensitivität (B). Die Komplementation des 12458-Verlustmutante mit PYL4 (rote Dreiecke) oder PYL5 (orangene Dreiecke) konnte das Wildtyp-Verhalten nicht wiederherstellen (C). ($n \geq 5$, $Mw \pm SE$)

Die Komplementation dieser Mutante mit den ABA-Rezeptoren PYL4 (Abbildung 3-2 C, rote Dreiecke) oder PYL5 (Abbildung 3-2 C, orangene Dreiecke) führte zu keiner Erhöhung der ABA-Sensitivität. Die relative Transpiration dieser Mutanten stieg trotz der ABA-Vorinkubation durch die Belichtung deutlich bis auf das Niveau der 12458 an.

Die Komplementation mit PYR1 (Abbildung 3-2 B, blaue Rauten) erhöhte die ABA-Sensitivität der 12458-Verlustmutante allerdings teilweise. Die relative Transpiration von PYR1::12458 stieg nur um 15% im Vergleich zum Dunkelwert an, wobei die Zunahme bereits nach 15min eine Sättigung erreichte. Die Komplementation mit dem ABA-Rezeptor PYL2 führte dagegen zu einer vollständigen Wiederherstellung des Wildtypverhaltens.

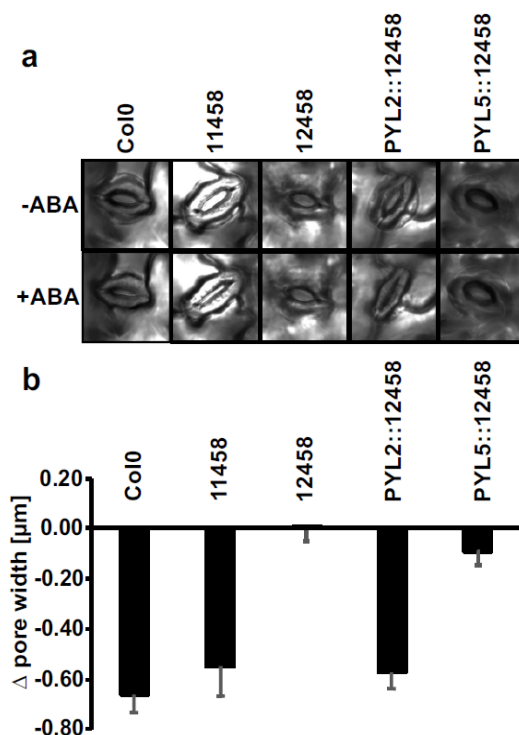


Abbildung 3-3: ABA-Antwort einzelner Stomata der Arabidopsis ABA-Rezeptormutanten

A: Elektro-Infusion von 50µM ABA führte bei Wildtyp-Pflanzen (Col-0), der 11458-Verlustmutante (PYL2 vorhanden) und der PYL2::12458 Komplementationslinie innerhalb von 10min zum Stomaschluss, wohingegen die 12458-Verlustmutante (PYL1 vorhanden) sowie die PYL5::12458 komplementierten Pflanzen insensitiv gegenüber dem ABA waren. B: Die Amplituden der Stomabewegung von vollständig geöffnet bis maximal geschlossen der 11458-Verlustmutante und der PYL2::12458 Komplementationslinie waren mit der des Wildtyps vergleichbar. Die Stomata der 12458 blieben vollständig geöffnet und die PYL5::12458 Komplementation führte zu einer leichten Stomabewegung, die allerdings ABA-unabhängig war ($n \geq 4 \pm$ Stabw).

Das Experiment wurde von Johannes C. B. Herrmann des Lehrstuhls für Botanik I (JvS-Institut Uni Würzburg) durchgeführt und die Abbildung wurde freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Zusätzlich zu den Gaswechselfmessungen wurde die ABA-induzierte Bewegung einzelner Stomata mikroskopisch verfolgt (Daten von Johannes Herrmann). Dazu wurden 50µM ± ABA mittels Elektro-Infusion an vollständig geöffnete, lichtadaptierte Stomata ausgewählter ABA-Rezeptormutanten appliziert und der Stomaschluss mikroskopisch verfolgt (Abbildung 3-3; zur Verfügung gestellt von J. C. B. Herrmann). Dabei bestätigten sich die Ergebnisse der Gaswechselfmessungen. Nur die Stomata von Pflanzen, die über ein funktionales PYL2-Gen verfügten, zeigten innerhalb von 10min einen ABA-induzierten Stomaschluss (Abbildung 3-3 A) und die Amplitude dieser Stomabewegung war bei 11458-Verlustmutanten (PYL2 vorhanden) sowie der PYL2::12458 Komplementationslinie vergleichbar mit Wildtyp-Pflanzen (Abbildung 3-3 B).

Die Gaswechselfmessungen sowie die Messungen individueller Stomabewegungen deuteten auf eine wesentliche Rolle von PYL2 beim ABA-induzierten Stomaschluss hin, aber auch PYR1 scheint, wenn auch in geringerem Maße als PYL2, an der Perzeption und

Signaltransduktion beim ABA-induzierten Stomaschluss von Arabidopsis beteiligt zu sein. Dass die Komplementation mit PYL4 und PYL5 nicht zu einer Erhöhung der Sensitivität der lichtinduzierten Stomaöffnung der 12458-Verlustmutante gegenüber ABA führte, deutet darüber hinaus auf weitere funktionelle Unterschiede zwischen den einzelnen Rezeptoren hin.

3.1.1.2 CO₂

Für eine dreifach ABA-Rezeptormutante, in der die Rezeptoren PYR1, PYL1 und PYL4 nicht funktionell exprimiert werden, wurde bereits eine verminderte Reaktionsfähigkeit gegenüber einem schnellen Anstieg des atmosphärischen CO₂-Gehalts gezeigt (Chater et al. 2015), was die direkte Beteiligung der ABA-Rezeptoren am CO₂-induzierten Stomaschluss nahelegt. Daher wurde zusätzlich zur direkten ABA-Antwort auch die Antwort der Schließzellen auf eine schnelle Erhöhung der atmosphärischen CO₂-Konzentration untersucht. Mittels IRGA wurden die Stomabewegungen intakter Pflanzen nach Änderungen der atmosphärischen CO₂-Konzentration bestimmt. Dafür wurden dunkeladaptierte Pflanzen für 1h bei ambientem CO₂ (400ppm) beleuchtet, bevor die CO₂-Konzentration schlagartig auf 1000ppm erhöht wurde.

Die Beleuchtung der Pflanzen führte in allen Fällen zu einem Anstieg der relativen Transpiration. Bei Wildtyp-Pflanzen (Abbildung 3-4 A, schwarze Quadrate) war dieser Anstieg schneller und stärker als bei beiden fünffach Verlustmutanten (Abbildung 3-4 A, graue bzw. weiße Kreise), die bereits im Dunkeln höhere Transpirationsraten als der Wildtyp zeigten. Die stomatare Antwort auf die plötzliche Erhöhung der CO₂-Konzentration der 12458 (PYL1 vorhanden) sowie der 11458 (PYL2 vorhanden) war verglichen mit Wildtyp-Pflanzen unvollständig. Während die Transpirationsrate des Wildtyps innerhalb von rund 30min durch die Erhöhung des CO₂ fast bis auf das Dunkelniveau abfiel, war die Abnahme der relativen Transpiration der 12458- und der 11458-Verlustmutanten nur sehr gering und stieg über die Messdauer von gut 1,5h sogar wieder auf das Niveau bei 400ppm an (Abbildung 3-4 A). Die schließzellspezifische Komplementation der 12458 mit einzelnen Rezeptoren hatte bei CO₂, wie schon bei der Behandlung mit ABA, unterschiedliche Auswirkungen auf die stomatare Antwort. Die Komplementation von PYR1 in 12458-Schließzellen stellte die CO₂-Antwort teilweise wieder her (Abbildung 3-4 B, blaue Rauten) und die Transpiration fiel in Folge der CO₂-Erhöhung zwar weniger als bei Wildtyp-Pflanzen, aber dennoch deutlich ab. Interessanterweise hatte die Komplementation mit PYL2 (Abbildung 3-4 B, grüne Rauten) keinen messbaren Einfluss auf die CO₂-Sensitivität der 12458, obwohl dieser Rezeptor den größten Effekt auf die ABA-Inhibierung der lichtinduzierten Stomaöffnung hatte. Im Gegensatz dazu, nahm die relative Transpiration der mit PYL4 (Abbildung 3-4 C, rote Dreiecke) bzw. PYL5 komplementierten Pflanzen (Abbildung 3-4 C, orangene Dreiecke) durch den Anstieg

der CO₂-Konzentration fast bis auf das den Dunkelwert ab, was dem Verhalten von Wildtyp-Pflanzen entsprach.

Die PYL4- und PYL5-Expression in Schließzellen der 12458 stellten die CO₂-Sensitivität des Stomaschlusses vollständig wieder her, jedoch nicht die ABA-Antwort der lichtinduzierten Stomaöffnung (Abbildung 3-2 C), während PYL2 die ABA-Sensitivität, aber nicht den CO₂-induzierten Stomaschluss wiederherstellen konnte.

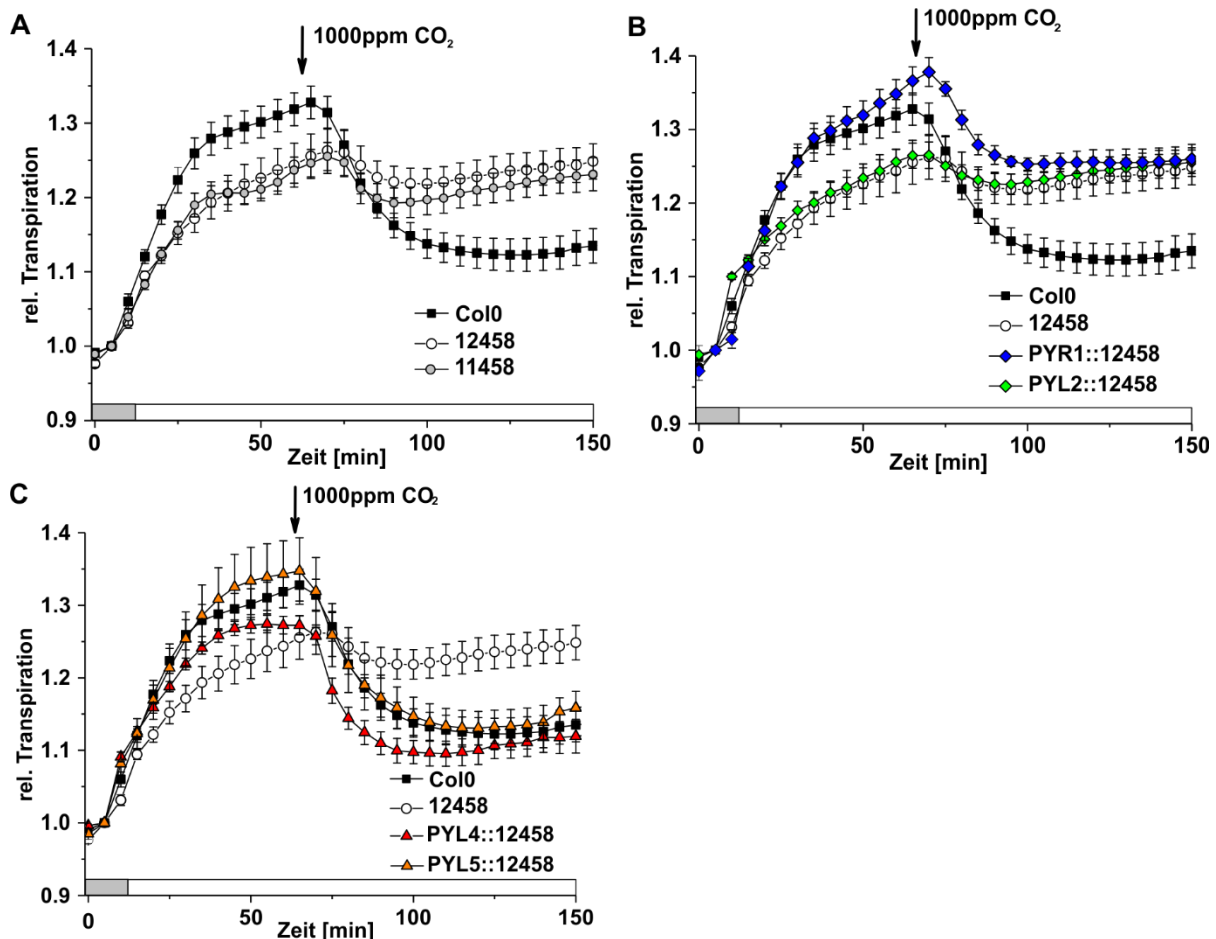


Abbildung 3-4: Stomatäre CO₂-Antwort von Arabidopsis ABA-Rezeptor Mutanten

Die Transpirationsraten von intakten *Arabidopsis thaliana* Pflanzen wurden mittels Infrarot-Gasanalyse bestimmt. Die Pflanzen wurden zunächst bei 400ppm CO₂ und 50 ± 5% rH bei 20°C dunkeladaptiert (grauer Kasten). Nach Stabilisierung der Transpirationsraten wurden die Pflanzen mit einer Intensität von 125µmol*m⁻²*s⁻¹ beleuchtet (weißer Kasten). Nach 1h Lichtadaption wurde das CO₂ auf 1000ppm erhöht (Pfeil). Sowohl die 12458 (weiße Kreise) als auch die 11458 (graue Kreise) haben verglichen mit Col-0 (schwarze Quadrate) einen CO₂ insensitiven Stoma-Phänotyp und die Erhöhung des atmosphärischen CO₂ führte nicht zum Stomaschluss (A). Die Komplementation mit PYR1 (blaue Rauten) stellte einen Teil des CO₂-induzierten Stomaschlusses im 12458-Hintergrund wieder her, während die Komplementation mit PYL2 (grüne Rauten) keinen Effekt auf die stomatäre CO₂-Antwort hatte (B). Die stomatäre Antwort auf die plötzliche Erhöhung des atmosphärischen CO₂ von PYL4::12458 (rote Dreiecke) sowie PYL5::12458 (orangene Dreiecke) glich der von Col-0 und war deutlich stärker ausgeprägt als in den 12458-Hintergrund Mutanten (C). (n ≥ 5, Mw ± SE)

3.1.2 ABA-abhängige PYR/PYL-Expression in Arabidopsis Schließzellen

Die Beteiligung unterschiedlicher ABA-Rezeptoren an der Signaltransduktion verschiedener Stoma-Schluss-signale deutet auf eine strenge Regulation des ABA-Signalwegs in Schließzellen hin. Da es sich bei 13 der 14 in Arabidopsis vorkommenden Mitgliedern der PYR/PYL-Familie um ABA-Rezeptoren handelt (Ma et al. 2009; Fujii et al. 2009; Szostkiewicz et al. 2010), wäre es möglich, dass neben der Änderung des ABA-Gehalts auch der Rezeptor-Pool in Schließzellen an externe und interne Stimuli angepasst wird und so neben der Signalspezifität auch eine längerfristige Adaption an Umweltbedingungen sichergestellt wird. Änderungen des ABA-Gehalts von Pflanzenzellen haben bekanntermaßen große Auswirkungen auf die Expression vieler Gene, einschließlich der PYR/PYL-Rezeptoren selbst (Gonzalez-Guzman et al. 2012) und Microarray-Daten von ABA-behandelten Schließzellen deuteten bereits an, dass sich die Rezeptor-Expressionen in ihrer ABA-Abhängigkeit unterscheiden (Tabelle 3-1). Daher wurde in einem Dosis-Wirkungsexperiment, in dem Arabidopsis Wildtyp-Pflanzen (siehe 2.1.1.1) mit verschiedenen ABA-Konzentrationen behandelt wurden, die ABA-Sensitivität der PYR/PYL-Expression in Schließzellen untersucht. Unterschiede der ABA-abhängigen PYR/PYL-Expression und damit der Menge einzelner Komponenten im Rezeptorpool bei verschiedenen ABA-Gehalten der Schließzellen könnten eine Möglichkeit der Anpassung an verschiedene Stomaschluss-Signale darstellen.

Mit Ausnahme des ABA-Rezeptors PYL1 wurde die Expression aller in Schließzellen exprimierten ABA-Rezeptoren durch die Behandlung mit ABA negativ beeinflusst. Allerdings unterschied sich dabei die Sensitivität der Rezeptorexpression. Während die Expression des Rezeptors PYR1 nur bei der höchsten applizierten ABA-Konzentration von $50\mu\text{M} \pm \text{ABA}$ signifikant reduziert war (Abbildung 3-5 A), war die Sensitivität der Expression von PYL2, 5 und 8 höher und reagierte bereits bei einem Zehntel der ABA-Konzentration (Abbildung 3-5 C, D und E). Die höchste ABA-Sensitivität wurde für PYL4 gefunden, dessen Expression 100fach sensitiver als PYR1 auf ABA reagierte. Auch die Stärke der Repression unterschied sich zwischen den einzelnen Rezeptoren. Während die Transkriptmenge der Rezeptoren PYL2, 4 und 5 der mit hochkonzentrierter ABA-Lösung (5 bzw. $50\mu\text{M} \pm \text{ABA}$) besprühten Pflanzen um ca. 60% bzw. 75% abnahm, war die Abnahme von PYR1 und PYL8 mit 40 bis 50% deutlich geringer (Abbildung 3-5 A und F). Diese Unterschiede in der Sensitivität der Rezeptorexpression gegenüber einem Anstieg der zellulären ABA-Konzentration deuten auf eine ABA-regulierte Adaption des Rezeptorpools von Arabidopsis Schließzellen hin. Dabei war die ABA-Sensitivität der Rezeptorexpression insgesamt vergleichbar mit der von anderen typischen ABA-regulierten Genen (Abbildung 3-6).

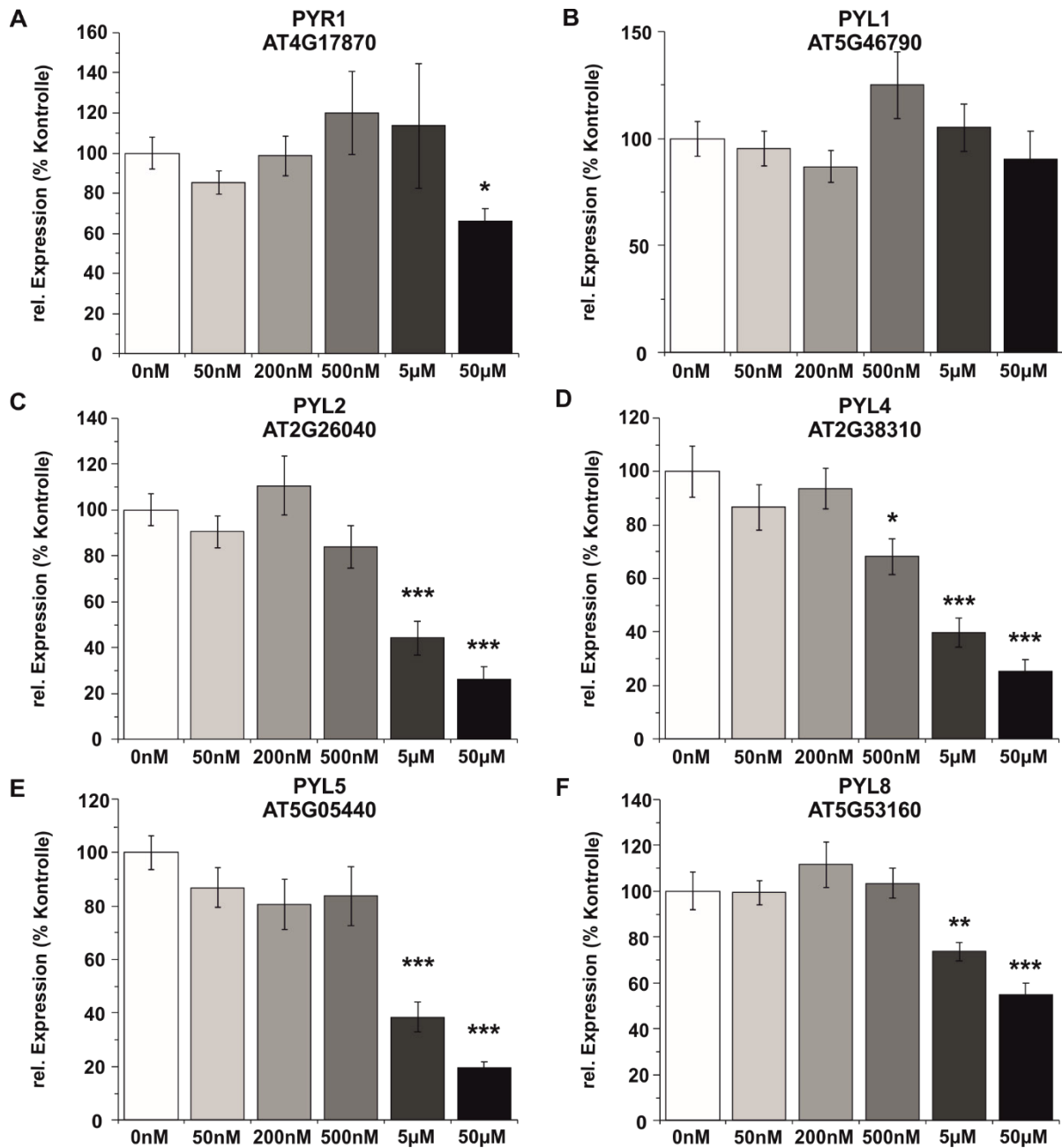


Abbildung 3-5: ABA-Sensitivität der ABA-Rezeptor Expression in Schließzellen von Arabidopsis.

Die Expression von PYR1 (A), PYL2 (C), PYL5 (E) und PYL8 (F) wurde in Arabidopsis (Col-0) Schließzellen nur durch die Behandlung mit hochkonzentriertem ABA (5 bzw. 50µM ± ABA) reprimiert. Die PYL4-Expression (D) zeigte die höchste ABA-Sensitivität und wurde bereits bei 500nM ± ABA signifikant beeinflusst, während die PYL1-Expression (B) vollständig ABA-insensitiv war. (n ≥ 16, Mw ± SE, signifikante Unterschiede zwischen Kontrollen (0nM) und den Schließzellproben für 4h mit ABA-behandelten Pflanzen (50nM bis 50µM) sind markiert als * p ≤ 0,05, ** p ≤ 0,01 und *** p ≤ 0,001. Werte sind auf 10000 Moleküle des Housekeeping-Gens Act2/8 bezogen und auf 100% Expression in Kontrollpflanzen normiert)

Die Expression des zur Familie der LEA-Proteine (englisch: *late embryogenesis abundant proteins*) gehörenden ABR, der PP2C-Phosphatase HAI1 (englisch: *highly ABA induced 1*) sowie von KIN2 (englisch: *cold inducible 2*) werden stark durch hohe ABA-Konzentrationen induziert (Huang et al. 2008; Bauer et al. 2013). Die ABA-Sensitivität der Transkription dieser Gene war, wie die der PYR/PYLs, verschieden. ABR und HAI1 wurden schon bei 5 μ M ABA deutlich induziert (Abbildung 3-6 A und B) während die KIN2-Expression (*cold induced 2*) bereits bei 200 nM \pm ABA anstieg. Die Expression des Transkriptionsfaktors MYB60 wurde erst bei der höchsten Konzentration von 50 μ M \pm ABA signifikant reprimiert (Abbildung 3-6 D).

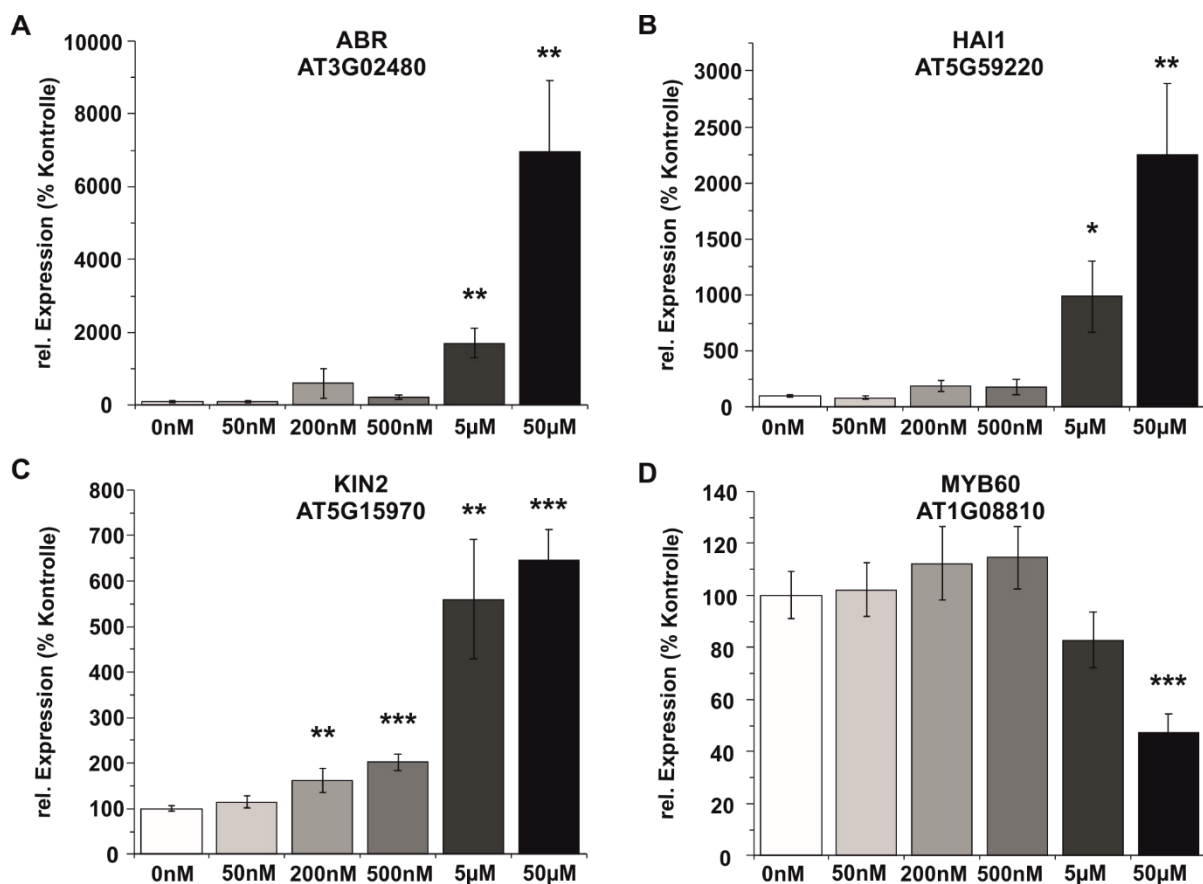


Abbildung 3-6: ABA-abhängige Expression typischer ABA-kontrollierter Gene.

Die Expression von ABR (A) und HAI1 (B) wurde in Schließzellen von *Arabidopsis thaliana* Col-0 durch Besprühen mit ABA-Lösung ab 5 μ M \pm ABA induziert, während die KIN2 Expression (C) bereits ab 200 nM signifikant induziert wurde. Die Expression von MYB60 (D) zeigte die geringste ABA-Sensitivität und wurde erst bei 50 μ M \pm ABA reprimiert. (n \geq 16, Mw \pm SE, signifikante Unterschiede zwischen Kontrollen (0nM) und den Schließzellproben 4h mit ABA-behandelten Pflanzen (50nM bis 50 μ M) sind markiert als * p \leq 0,05, ** p \leq 0,01 und *** p \leq 0,001, Werte sind auf 10000 Moleküle des Housekeeping-Gens Act2/8 bezogen und auf 100% Expression in Kontrollpflanzen normiert).

3.1.3 Funktionelle Unterschiede der PYR/PYL-Rezeptoren auf transkriptioneller Ebene

Änderungen des zellulären ABA-Gehalts haben generell einen großen Einfluss auf die Genexpression pflanzlicher Zellen (siehe 3.1.2 und 3.1.3). Microarray-Daten zeigten, dass rund 1500 Transkripte in Arabidopsis Schließzellen ABA-sensitiv sind, wobei ein Großteil der Transkripte durch ABA induziert und nur rund ein Drittel reprimiert wurden (Yang et al. 2008; Wang et al. 2011; Bauer et al. 2013). Es konnte auch gezeigt werden, dass der Stomaschluss durch absinkende Luftfeuchtigkeit über das Hormon ABA vermittelt wird. Dennoch unterschied sich die expressionelle Reaktion von Schließzellen auf direkte ABA-Gabe von der Reaktion auf die Änderung der Luftfeuchte (Bauer et al. 2013). Ob auch die Spezifität dieser längerfristigen expressionellen Adaption von Schließzellen an verschiedene Umweltsituationen durch die ABA-Rezeptoren vermittelt wird, sollte im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit mittels qPCR Untersuchungen ausgewählter Transkripte geprüft werden. Die unterschiedliche ABA-Sensitivität der Rezeptorexpression (Abbildung 3-5) zusammen mit den Ergebnissen des bereits erwähnten Microarray Experiments (Tabelle 2-1), indem jedes Stomaschluss-Signal Auswirkungen auf die Expression eines individuellen Sets an PYR/PYL-Rezeptoren hatte, deuten an, dass die Zusammensetzung des Rezeptor-Pools von Schließzellen streng reguliert und an die jeweiligen Bedingungen angepasst wird. Diese Adaption der Rezeptorqualität und -quantität könnte dann über bislang nicht identifizierte, für jeden Rezeptor spezifische Signalkaskaden unterschiedliche nachgeschaltete Gene regulieren, und so eine signalspezifische Schließzellreaktion hervorrufen.

Um zu überprüfen, ob verschiedene Gene unter der Kontrolle unterschiedlicher ABA-Rezeptoren stehen, wurden Arabidopsis Wildtyp-Pflanzen sowie die verschiedenen Rezeptormutanten mit $50\mu\text{M} \pm$ ABA besprüht und die Änderungen der Transkriptmengen der ABA-regulierten Gene MYB60, ABI1, ABI2, KCR2 und CIPK25 (Bauer et al. 2013) 4h nach ABA-Gabe untersucht (Abbildung 3-7). Diese Gene wurden ausgewählt, da sie in vorangegangenen Microarray-Experimenten als stark ABA-abhängig charakterisiert worden waren (Bauer et al. 2013).

Die ABA-Behandlung führte in Wildtyp-Schließzellen zu einer Verdreifachung der Transkriptmenge der beiden ABA-induzierbaren PP2C-Phosphatasen ABI1 und ABI2 (Abbildung 3-7 A-D). Dieselbe Induktion konnte auch in Schließzellproben der 12458-Verlustmutanten (PYL1 vorhanden) sowie den dazugehörigen Komplementationslinien nachgewiesen werden (Abbildung 3-7 A und C), wenn auch im Fall von PYR1 nicht signifikant. Im Gegensatz dazu wurden ABI1 und ABI2 in der 11458-Verlustmutante (PYL2 vorhanden) nicht induziert und nur eine Komplementation mit PYR1 und PYL1 stellten die ABA-Sensitivität

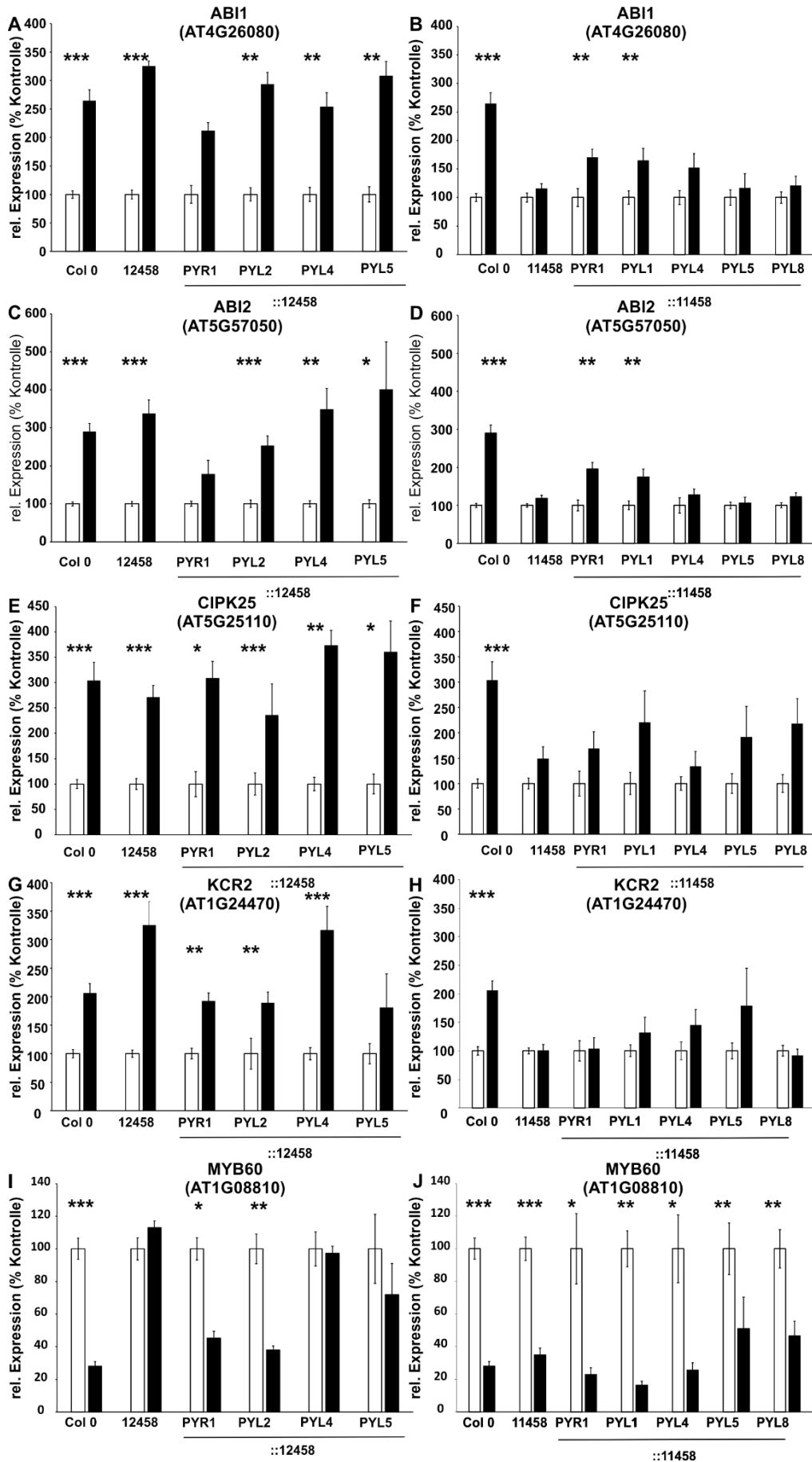


Abbildung 3-7: ABA-induzierte Änderungen der Transkriptmenge ABA-regulierter Gene in Schließzellen von Arabidopsis Wildtyp-Pflanzen und den ABA-Rezeptormutanten

ABI1 (A und B), ABI2 (C und D), CIPK25 (E und F) und KCR2 (G und H) wurden in Schließzellproben von Wildtyp-Pflanzen (Col-0), der 12458-Verlustmutante (PYL1 vorhanden) sowie den dazugehörigen Komplementationslinien durch eine 4h ABA-Inkubation (schwarz) im Vergleich zu Kontrollpflanzen (weiß) induziert, nicht aber in der 11458-Verlustmutante (PYL2 vorhanden). Die Komplementation mit PYR1 und PYL2 konnte die ABA-Sensitivität von ABI1 und ABI2 in der 11458-Verlustmutante wiederherstellen (B und D). Umgekehrt wurde MYB60 nur in der 11458-Verlustmutante ähnlich wie in Col-0 durch ABA reprimiert (J) und nur die Komplementation mit PYR1 und PYL2 konnte die ABA-Sensitivität von MYB60 in der 12458-Verlustmutante wiederherstellen (I). (Dargestellt sind qPCR-Ergebnisse auf 10000 Moleküle des Housekeeping-Gens Act2/8 bezogen und auf die Expression in Kontrollpflanzen (100%) normiert, $n \geq 5$, $Mw \pm SE$, signifikante Unterschiede zwischen Kontrollen und den Schließzellproben ABA-behandelter Pflanzen ($50\mu M \pm ABA$) sind markiert als * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ und *** $p \leq 0,001$).

der Expression beider Phosphatasen wieder her (Abbildung 3-7 B und D), was auf eine Regulation der Expression von ABI1 und ABI2 durch PYL1 und PYR1 hindeutet. Auch CIPK25 und KCR2 wurden nur in der 12458-Verlustmutante sowie den korrespondierenden Komplementationslinien und Wildtyp-Pflanzen induziert, nicht aber in der 11458-Verlustmutante oder den dazugehörigen Komplementationslinien (Abbildung 3-7 E-H), was ebenfalls funktionale Unterschiede der verschiedenen ABA-Rezeptoren auf expressioneller Ebene andeutet.

Das einzige untersuchte Gen, dass im Wildtyp negativ durch ABA reguliert wurde, war der Transkriptionsfaktor MYB60. Die Inkubation mit ABA für 4h führte zu einer Abnahme der MYB60 Transkriptmenge um rund 70% im Wildtyp. Interessanterweise konnte diese Negativ-Regulierung von MYB60 nur in der 11458-Verlustmutante (PYL2 vorhanden), nicht aber in der 12458-Verlustmutante (PYL1 vorhanden) nachgewiesen werden (Abbildung 3-7 I und J). Und nur die Komplementation der 12458-Verlustmutante mit entweder PYL2 oder PYR1 konnten die ABA-Sensitivität der MYB60 Expression wiederherstellen, die Komplementation mit PYL4 oder PYL5 hatte dagegen keinen Effekt (Abbildung 3-7 I). Die MYB60 Expression scheint demnach, anders als CIPK25 oder KCR2, unter der Kontrolle von PYL2 und PYR1 zu stehen.

Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass die Rezeptoren weder auf der funktionellen, noch auf der expressionellen Ebene redundant agieren, sondern dass jeder Rezeptor spezifische Aufgaben erfüllt.

3.2 Dattelstomata unterscheiden sich in ihrer Reaktion auf externe und interne Stimuli von Arabidopsis

Während heute über die Schließzellphysiologie von Pflanzen im Allgemeinen viel bekannt ist und die Forschung an gut untersuchten Modellpflanzen wie *Arabidopsis thaliana* mittlerweile hauptsächlich auf molekularer Ebene stattfindet, ist über die Physiologie der Schließzellen vieler anderer Pflanzen wenig bekannt. Dabei könnten spezialisierte Pflanzen wie die Dattelpalmen, die besonders gut an extreme Standorte angepasst sind, über andere, bisher unbekannte Regulationsmechanismen verfügen, die es ihnen erst ermöglichen, an lebensfeindlichen Standorten zu existieren. Das natürliche Habitat von Dattelpalmen sind heiße, trockene Standorte mit hohen Lichtintensitäten (Zaid und de Wet 2002). In vergleichenden Blattgaswechseluntersuchungen von Fiederblättern der Dattelpalme und der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* sollten darum Hinweise auf die stomatären Anpassungsstrategien der Dattelpalme gewonnen werden (siehe 2.3.4).

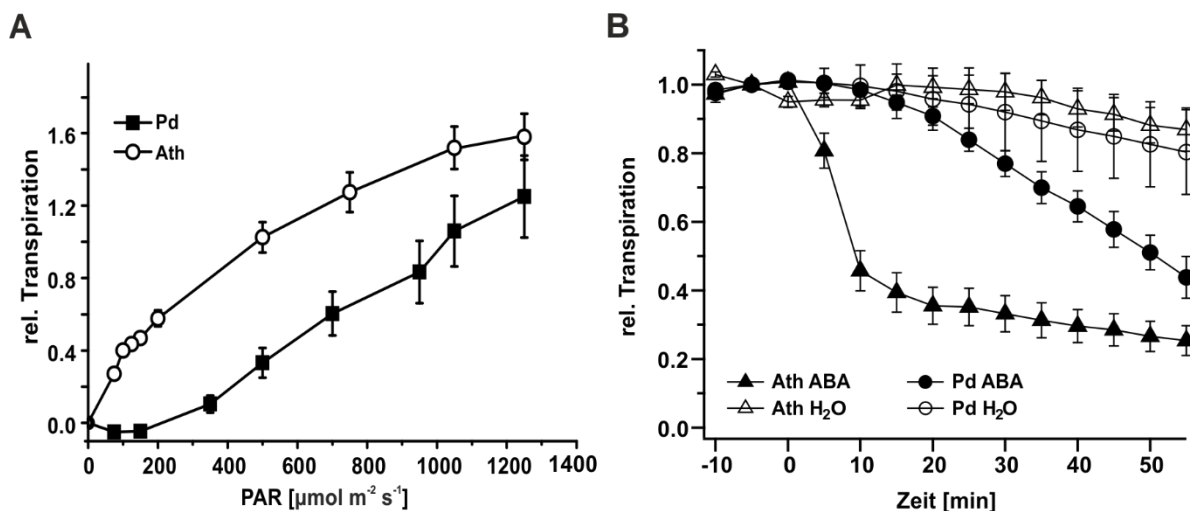


Abbildung 3-8: Stoma-Physiologie von Dattelpalmen und Arabidopsis

A: Die relative Transpiration von Arabidopsis Blättern (Ath, weiß) nahm schon bei geringen Lichtintensitäten deutlich zu und ging ab $800 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ in Sättigung. Die rel. Transpiration einzelner Fiederblätter der Dattelpalme (*Phoenix dactylifera*, Pd, schwarz) nahm erst ab einer Lichtintensität von $350 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ zu und zeigte keine Sättigung bei hohen Lichtintensitäten. Dargestellt sind $\text{Mw} \pm \text{SE}$ von Blattgaswechselfmessungen bei 400 ppm CO_2 und $50 \pm 5\% \text{ rH}$ bei 20°C an abgetrennten Blättern bezogen auf die Transpirationsraten bei Dunkelheit. $n \geq 8$.

B: Die stomatäre Antwort von Fiederblättern der Dattelpalme (Pd, Kreise) auf $50 \mu\text{M} \pm \text{ABA}$ (schwarz, Zeitpunkt 0min) war im Vergleich zu Arabidopsis (Ath, Dreiecke) nur langsam und unvollständig. 15min nach ABA-Zugabe waren die Stomata von Arabidopsis vollständig geschlossen, während zu diesem Zeitpunkt der Stomaschluss der Dattelpalmen gerade erst begann. Dargestellt sind $\text{Mw} \pm \text{SE}$ von IRGA-Messungen bei 400 ppm CO_2 und $50 \pm 5\% \text{ rH}$ bei 20°C und einer Lichtintensität von $125 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ für Arabidopsis bzw. $1000 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ für *P. dactylifera*. $n \geq 6$.

Dabei zeigten sich schon im lichtabhängigen Stomaöffnungsverhalten beider Arten deutliche Unterschiede (Abbildung 3-8 A). Die Transpiration von Fiederblättern der Dattelpalme nahm erst ab hohen Lichtintensitäten von ca. $300\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ und höher zu (Abbildung 3-8 A, schwarz), wohingegen die Transpirationsrate von Arabidopsis bereits bei niedrigen Lichtintensitäten deutlich anstieg und schon bei $100\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ rund 40% über dem Dunkelwert lag (Abbildung 3-8 B, weiß). Bei sehr hohen Lichtintensitäten von über $1000\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ nahm die Transpiration von Fiederblättern der Dattelpalmen weiter zu und innerhalb der applizierten Lichtintensitäten war keine Sättigung erkennbar, während die Stomata von Arabidopsis bereits bei ca. $800\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ die größte Öffnungsweite erreicht hatten und die Transpirationsrate damit die Sättigung erreichte. Dattelpalmen scheinen demnach in der Lage zu sein, bei geringen, vermutlich für sie photosynthetisch ineffizienten Lichtintensitäten ihre Stomata geschlossen und so den transpirationellen Wasserverlust niedrig zu halten.

Der bemerkenswerteste Unterschied in der Stomaphysiologie von Dattelpalmen und Arabidopsis lag allerdings in der ABA-Antwort (Abbildung 3-8 B). Der Stomaschluss durch über die Petiole verabreichtes ABA ($50\mu\text{M} \pm \text{ABA}$) begann bei Arabidopsis bereits nach 5min und war nach 20min fast vollständig abgeschlossen (Abbildung 3-8 B, schwarze Dreiecke). Die Transpiration der Dattelpalmen nahm dagegen erst ca. 15min nach ABA-Zugabe ab (Abbildung 3-8 B, schwarze Kreise). Außerdem war der ABA-induzierte Stomaschluss deutlich langsamer und innerhalb der Messdauer noch nicht abgeschlossen.

Um auszuschließen, dass die langsamere ABA-Antwort der Phoenix Fiederblätter die Folge einer geringeren Transportgeschwindigkeit des ABA im Leitgewebe war, wurde die Fließgeschwindigkeit des photosynthetischen Elektronentransportblockers DCMU mittels Chlorophyllfluoreszenzmessungen untersucht. Durch DCMU induzierte Änderungen der Chlorophyllfluoreszenz konnte die Transportgeschwindigkeit des DCMU zwischen zwei Punkten errechnet werden. Da die Transpiration der Blätter einen Einfluss auf die Fließgeschwindigkeit des Xylems hat, wurde die DCMU-Ausbreitung bei den in den Gaswechsellmessungen verwendeten Lichtintensitäten durchgeführt (siehe 2.4).

Dabei war die Fließgeschwindigkeit des DCMU zwischen zwei Punkten der Fiederblätter von Datteln mit ca. 4mm/s sogar tendenziell schneller als in Arabidopsis Blättern (Abbildung 3-9). Dieses Ergebnis deutete darauf hin, dass die verminderte Reaktionsgeschwindigkeit der Stomata von *Phoenix dactylifera* nicht an einer geringeren Fließgeschwindigkeit des ABAs im Leitgewebe lag, sondern andere, stomaphysiologische Ursachen haben musste.

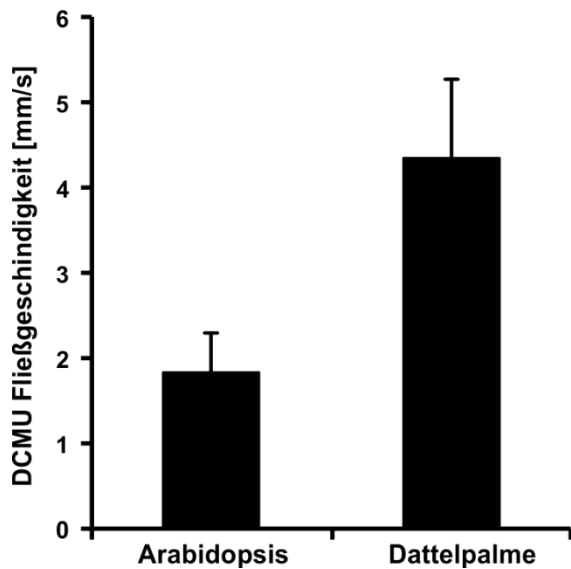


Abbildung 3-9: Fließgeschwindigkeit von DCMU im Leitgewebe von Arabidopsis und Dattelpalmen

Die Änderung der Fluoreszenz F durch DCMU wurde mittels Chlorophyllfluoreszenzmessungen verfolgt. Die Geschwindigkeit der Ausbreitung des DCMU wurde aus der Dauer der Ausbreitung zwischen zwei Punkten an einzelnen Blättern berechnet. Dargestellt sind $Mw \pm SE$, $n \geq 9$.

Eine entscheidende Rolle beim (ABA-induzierten) Stomaschluss spielt der Anionen-Kanal SLAC1 (siehe 1.3.2). Für OsSLAC1, dem Homolog von AtSLAC1 aus der monokotylen Nutzpflanze Reis (*Oryza sativa*) wurde gezeigt, dass dieser eine deutlich höhere Permeabilität für NO_3^- gegenüber Chlorid besitzt (Sun et al. 2016). Daher wurde mittels IRGA-Messungen untersucht, ob eine Erhöhung der Chlorid- bzw. der Nitratverfügbarkeit den ABA-induzierten Stomaschluss von Dattelpalmen verbessert. In Abwesenheit von ABA hatte die Zugabe von 5mM KCl bzw. 5mM KNO_3 in den Transpirationsstrom weder bei Arabidopsis (Abbildung 3-10 B und D) noch bei Dattelpalmen (Abbildung 3-10 A und C) einen messbaren Effekt auf die stomatäre Leitfähigkeit. In Anwesenheit von ABA hatte die Zugabe von KCl über die Petiole ebenfalls bei beiden Arten keinen Einfluss auf die ABA-Antwort. Die Abnahme der relativen Transpiration war vergleichbar mit der von nur mit ABA behandelten Blättern (Abbildung 3-10 C und D). Allerdings führte die Anwesenheit von KNO_3 zu einer deutlich schnelleren Reaktion der Stomata von Dattelpalmen auf ABA (Abbildung 3-10 A, schwarze Dreiecke). Die ABA-bedingte Abnahme der relativen Transpiration begann in Gegenwart von KNO_3 bereits ca. 10min nach ABA-Gabe und erreichte innerhalb von ca. 35min die Sättigung, was zeigte, dass der ABA-induzierte Stomaschluss von Dattelpalmen nitratabhängig erfolgt. Bei Arabidopsis dagegen hatte KNO_3 keinen Effekt auf den Stomaschluss (Abbildung 3-10 B, schwarze Dreiecke bzw. Kreise).

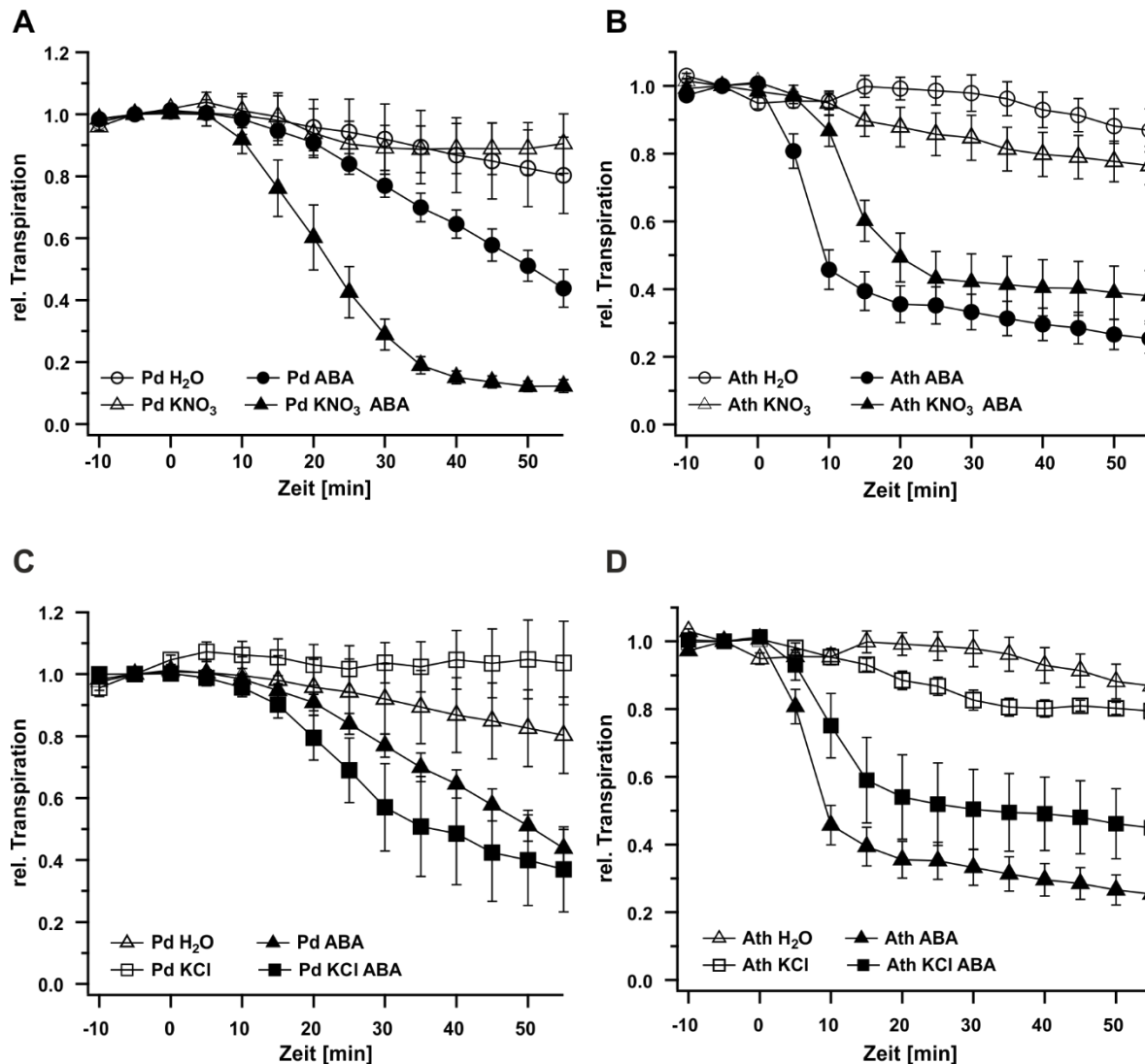


Abbildung 3-10: Auswirkungen von Nitrat und Chlorid auf den ABA-induzierten Stomaschluss von *Phoenix dactylifera* und *Arabidopsis*

IRGA-Messungen der Transpirationsraten von abgetrennten Fiederblättern von Dattelpalmen (A und C) sowie Blättern von Arabidopsis (B und D).

A: Die gleichzeitige Zugabe von 5mM KNO₃ zusammen mit ABA (schwarze Dreiecke) in den Transpirationsstrom von Fiederblättern von Dattelpalmen führte zu einer schnelleren und stärkeren ABA-Antwort der Stomata im Vergleich zu alleiniger ABA-Zugabe (schwarze Kreise).

B: KNO₃ hatte keinen Einfluss auf den ABA-induzierten Stomaschluss von *Arabidopsis thaliana* Col-0.

C und D: Die Zugabe von 5mM KCl hatte weder bei Dattelpalmen noch bei Arabidopsis einen Effekt auf den Stomaschluss durch ABA. Dargestellt sind Mw ± SE, n ≥ 5.

Die Regulationsmechanismen der Stomaöffnungsweite der stresstoleranten Dattelpalme unterschieden sich demnach in wesentlichen Punkten von denen der Modellpflanze Arabidopsis. Die Ergebnisse zeigten, dass die lichtinduzierte Stomaöffnung der Dattelpalmen deutlich höhere Lichtintensitäten benötigt und dass der ABA-induzierte Stomaschluss nitratabhängig ist. So können Dattelpalmen unnötigen Wasserverlust bei geringen Lichtintensitäten vermeiden und verfügen möglicherweise durch die Nitratabhängigkeit des

ABA-induzierten Stomaschluss über zusätzliche Regulationswege der Stomaöffnungsweite. Beides könnten Anpassungen an die extremen Bedingungen des natürlichen Lebensraums von Dattelpalmen darstellen. Um solche Unterschiede zu erkennen und damit die Strategien der Stresstoleranz aufzudecken, sind Untersuchungen an extrem angepassten Pflanzen unbedingt erforderlich.

3.3 Salzstress

3.3.1 Sind Dattelpalmen Salz-Exkluder?

Dattelpalmen weisen neben ihrer Toleranz gegenüber Hitze, Trockenheit und hohen Lichtintensitäten auch eine hohe Toleranz gegenüber salzigen Böden auf (Zaid und de Wet 2002; Yaish und Kumar 2015). Ähnlich wie bei der Stomaphysiologie, sind auch hier die molekularen Grundlagen wenig untersucht. In diesem Zusammenhang ist auch völlig unbekannt, ob Dattelpalmen überhaupt toxisches Natrium oder Chlorid aufnehmen. Daten zur Natriumlagerung innerhalb des adulten Pflanzenkörpers sind dabei widersprüchlich (Tripler et al. 2007; Alhammadi und Edward 2009) oder gar nicht verfügbar. Anatomisch weisen Palmen keine besonderen Anpassungen, wie beispielsweise Salzdrüsen, auf. Daher wurde mit flammenphotometrischen Messungen (siehe 2.2) an Wurzeln und Blättern überprüft, ob Dattelpalmen, die für sechs Wochen mit 600mM NaCl-Lösung, was dem Salzgehalt von Meerwasser entspricht, bewässert wurden, Na⁺-Ionen über die Wurzeln aufnehmen und wo dieses in den Pflanzen akkumuliert. Die Wurzeln von Dattelpalmen weisen keine eindeutige Wurzelhaarzone auf. Die meisten Pflanzen nehmen in dieser Zone aber Nährstoffe und damit auch Natrium auf. Da dieser Bereich bei Wurzeln der Dattelpalme nicht eindeutig bestimmt werden konnte, wurden die Wurzeln für die flammenphotometrischen Messungen in fünf Abschnitte unterteilt (Abbildung 2-5). Da mehrjährige Pflanzen außerdem oft alte Blätter als Salzspeicher nutzen, die dann abgeworfen werden (Munns 2002), wurden für die Untersuchung des Na⁺-Gehaltes je 3 Fiederblätter (Abbildung 2-5, oben, Mitte, unten) sowohl von adulten als auch juvenilen Wedeln gemessen (siehe 2.2.2).

3.3.2 Salzaufnahme und Lokalisation in *Phoenix dactylifera*

Insgesamt war der Natriumgehalt aller Wurzelabschnitte der Kontrollpflanzen deutlich niedriger als in den entsprechenden Abschnitten der salzbehandelten Pflanzen (Abbildung 3-11 A). Dabei war der Natriumgehalt im obersten Wurzelabschnitt der Kontrollpflanzen (Abbildung 3-11 A, W1 schwarz) am niedrigsten und stieg mit zunehmender Entfernung zum Wurzelansatz leicht bis auf $10,7 \pm 2,7$ mg/g TG in der Wurzelspitze (Abbildung 3-11, W5 schwarz) an. Die sechswöchige Behandlung mit 600mM NaCl führte zu einer starken Zunahme des Natriumgehalts in allen Wurzelabschnitten der Dattelpalmen (Abbildung 3-11 A,

grau), und zwar graduell steigend mit zunehmender Entfernung zum Wurzelansatz. Während sich der Natriumgehalt im obersten Wurzelabschnitt (W1) lediglich verdreifachte ($17,4 \pm 5,5\text{mg/g TG}$), konnte für die Wurzelspitze (W5) eine Zunahme des Natriums um gut das sechsfache gemessen werden ($70,4 \pm 15,9\text{mg/g TG}$).

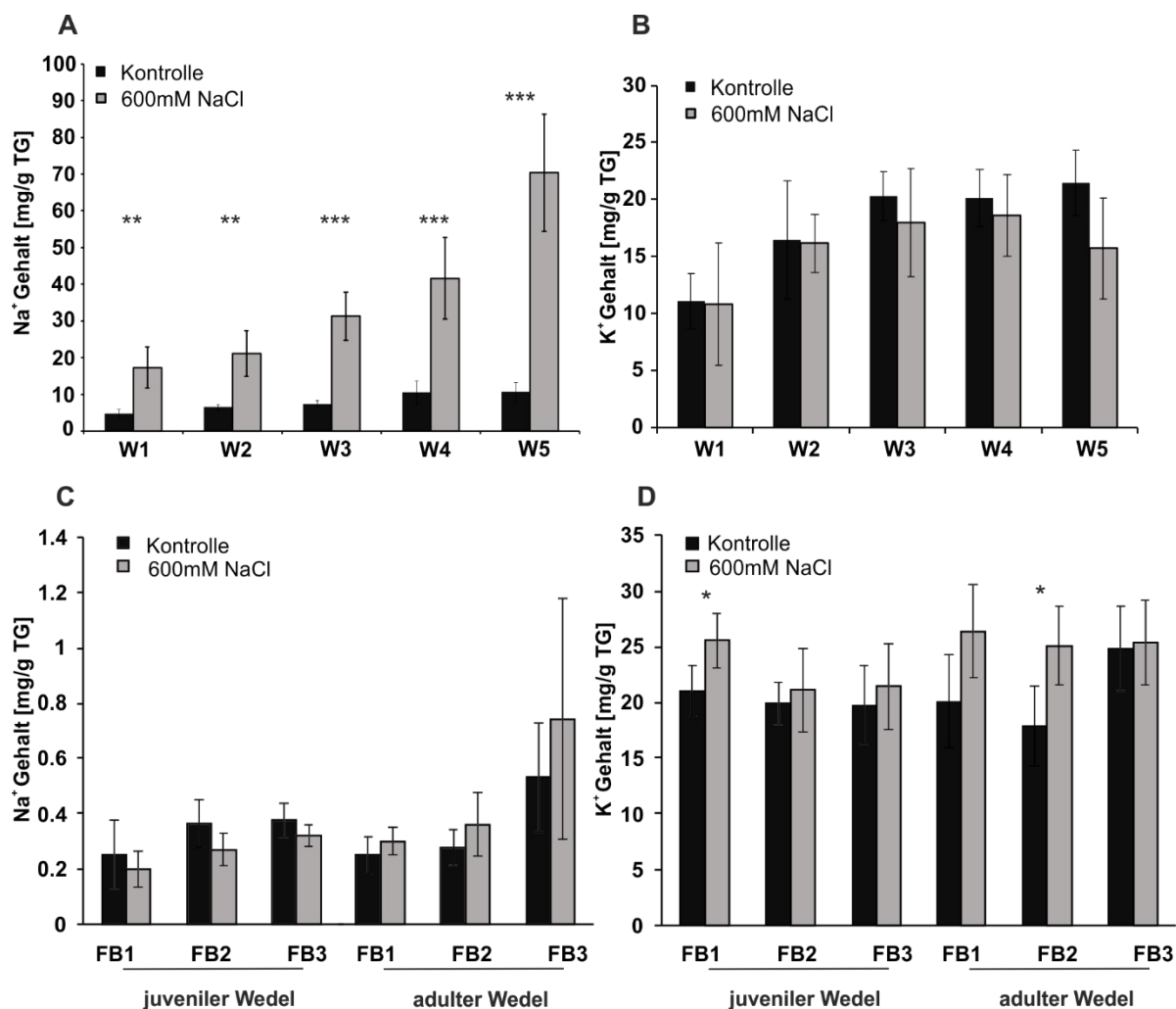


Abbildung 3-11: Natrium- und Kalium-Gehalt in Wurzeln und Fiederblättern von Dattelpalmen

(A) Der Natriumgehalt nach sechs Wochen Salzstress (600mM NaCl) (grau) war in allen Wurzelabschnitten signifikant höher als in entsprechenden Kontrollen (schwarz), wobei der Na⁺-Gehalt mit zunehmender Entfernung zum Wurzelansatz (W1) der salzbehandelten Wurzeln stetig anstieg und in der Wurzelspitze (W5) am höchsten war. (B) Die NaCl-Behandlung hatte keinen signifikanten Effekt auf den Kaliumgehalt der einzelnen Wurzelabschnitte. (C) In Fiederblättern von juvenilen sowie adulten Palmwedeln kam es durch die Salzbehandlung in keinem der beprobten Fiederblätter (FB1: Fiederblatt an der Wedelspitze, FB2: Fiederblatt aus der Mitte des Wedels, FB3: basales Fiederblatt) zu einem signifikanten Anstieg im Natriumgehalts. (D) Auch hier blieb der Kaliumgehalt von Fiederblättern adulter sowie juveniler Palmwedel unverändert. (Die Messwerte wurden flammenphotometrisch erhoben, $n \geq 5$, $Mw \pm Stabw$, signifikante Unterschiede zwischen Kontrollen und 600mM sind markiert als * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ und *** $p \leq 0,001$).

Der Na⁺-Gehalt in verschiedenen Fiederblättern adulter und juveniler Wedel der Kontrollpflanzen lag bei ca. 0,3mg/g TG und war deutlich niedriger als im Wurzelgewebe von Kontrollpflanzen. Interessanterweise war für keines der Fiederblätter eine signifikante Zunahme des Na⁺-Gehaltes durch die Bewässerung mit 600Mm NaCl-Lösung messbar (Abbildung 3-11 C). Dattelpalmen scheinen demnach über einen effektiven Mechanismus zu verfügen, Natrium aus den oberirdischen, photosynthetisch aktiven Pflanzenteilen auszuschließen.

Eine typische negative Auswirkung von Salzstress bei Pflanzen ist die drastische Verschiebung des Kalium/Natrium-Verhältnisses (Shabala und Cuin 2008). So führt langanhaltender Salzstress bei Arabidopsis nicht nur zur Aufnahme von Na⁺, sondern gleichzeitig auch zu einer deutlichen Abnahme der K⁺-Konzentration sowohl im Spross als auch in Wurzeln (Aleman et al. 2009b). Interessanterweise hatte die sechswöchige Salzbehandlung der Dattelpalmen keinen Einfluss auf den Kaliumgehalt des Gewebes (Abbildung 3-11 B und D), der mit rund 20mg/g TG für alle untersuchten Gewebe recht konstant war. Dattelpalmen scheinen demnach über einen effizienten Mechanismus zu verfügen, der es ihnen erlaubt, trotz erhöhter Natriumkonzentrationen im Boden ausreichend Kalium aufzunehmen bzw. die Abgabe von Kalium zu verhindern. Um dies zu überprüfen, wurde im Folgenden die Auswirkung von Salzstress auf die Expression einiger Na⁺- und K⁺-Transportproteine untersucht, von denen bekannt ist, dass sie in anderen Pflanzen in die Reaktion auf Salzbelastung involviert sind (siehe 1.5).

3.3.3 Expressionsänderungen in Wurzeln von *Phoenix dactylifera* unter Salzstress

Um die Ergebnisse der flammenphotometrischen Messungen des Natrium- und Kaliumgehalts (Abbildung 3-11) direkt mit der Expression von Transportproteinen der verschiedenen Wurzelabschnitte in Verbindung bringen zu können, wurde mRNA aus einem Teil des für die flammenphotometrischen Messungen geernteten Pflanzenmaterials gewonnen und für qPCR Untersuchungen einzelner pflanzlicher Natrium- und Kalium-Transportproteine eingesetzt. Dabei wurde im Besonderen die Expression der Natrium-Transportproteine SOS1 und NHX1 sowie der Kalium-Transportproteine HAK5 und KT, die in anderen Arten mit einer gesteigerten Salztoleranz in Verbindung gebracht wurden (siehe 1.5), untersucht.

Die Expression des putativen Tonoplasten-lokalisiereten Na⁺/H⁺-Antiporters PdNHX1 war zwischen den einzelnen Wurzelabschnitten der Kontrollpflanzen vergleichbar hoch und es konnte keine Salzabhängigkeit der Expression nachgewiesen werden (Abbildung 3-12 A). Interessanterweise konnte in diesen Wurzelabschnitten (W3-W5) aber eine Induktion des PdSOS1-Orthologs durch den Salzstress nachgewiesen werden, während in den oberen

Wurzelabschnitten W1 und W2, in denen der Natriumgehalt trotz Salzbehandlung gering blieb, keine Induktion nachgewiesen werden konnte (Abbildung 3-12 B). Eine erhöhte SOS1-Aktivität wurde bereits in anderen salztoleranten Arten wie *T. salsauginea* (Oh et al. 2009) nachgewiesen und stellt damit einen möglichen Weg des Natriumexports aus Dattelpflanzen dar.

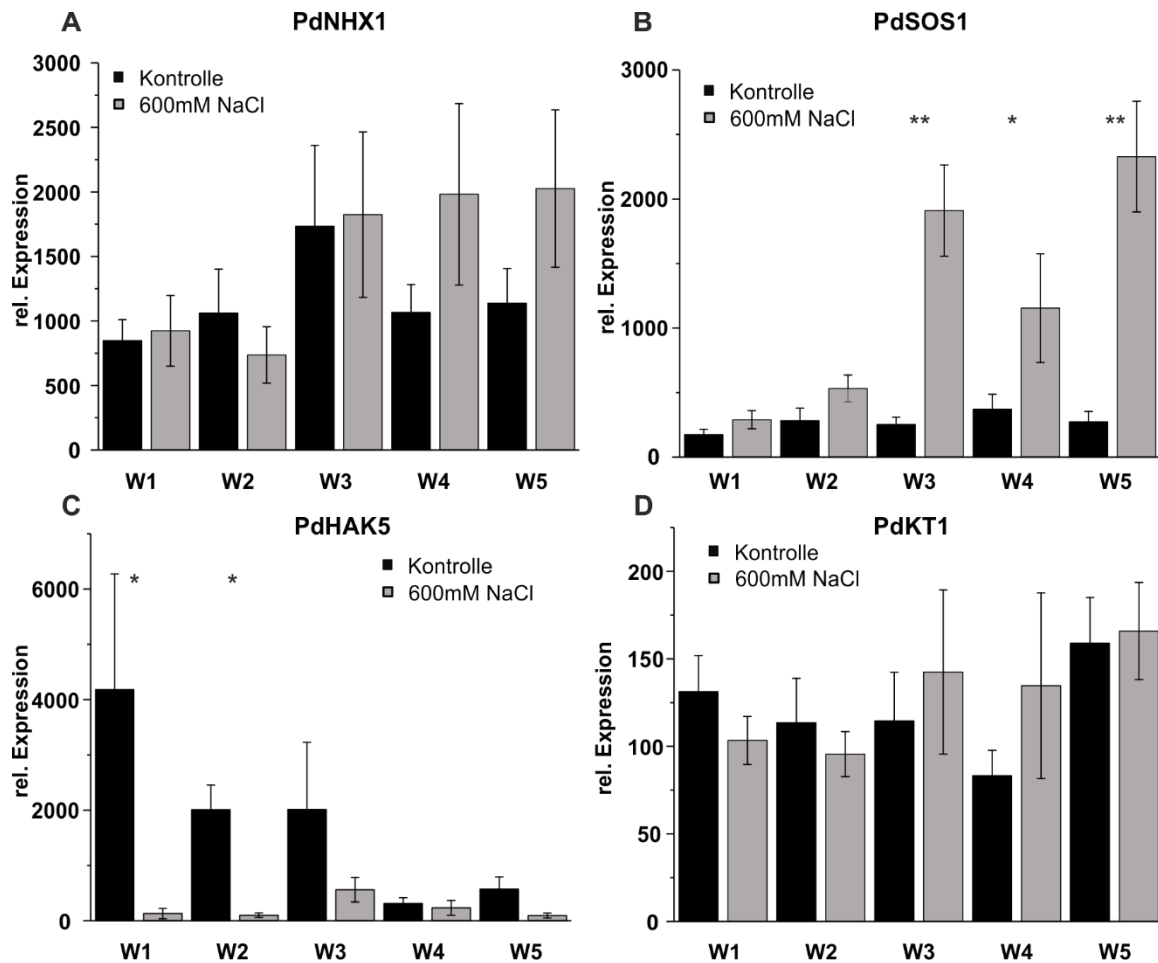


Abbildung 3-12: Salzabhängige Expression von Natrium- und Kalium-Transportproteinen in Wurzeln von *Phoenix dactylifera*.

Sechs Wochen Salzstress (600mM NaCl) (grau) hatten in keinem der Wurzelabschnitte (W1= Wurzelansatz bis W5= Wurzelspitze) einen Effekt auf die Expression von PdNHX1 (A). PdSOS1 (B) wurde in den Wurzelabschnitten nahe der Wurzelspitze (W5) durch die Salzbehandlung induziert. Die Expression von PdHAK5 (C) war in Wurzeln von Kontrollpflanzen (schwarz) am höchsten am Wurzelursprung (W1) und wurde zur Wurzelspitze hin immer geringer. Salz hatte einen negativen Effekt auf die PdHAK5-Expression in den oberen Wurzelabschnitten (W1-W3), aber keine Auswirkung auf die Transkriptmenge von PdKT1 (D). Dargestellt sind $Mw \pm SE$ von qPCR Messungen bezogen auf 10000 Transkripte des Housekeeping-Gens PdEF1 α . (n \geq 3, signifikante Unterschiede zwischen Kontrollen und 600mM sind markiert als * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ und *** $p \leq 0,001$).

Die Dattelpalmen zeigten in allen untersuchten Geweben ein nahezu unverändertes K^+/Na^+ -Verhältnis unter Salzstress. Daher wurde auch der Effekt von Salz auf die Expression der putativen Kalium-Transportproteine PdHAK5 und PdKT1 untersucht (Abbildung 3-12 C und D). Trotz vergleichbarer Kaliumgehalte in den einzelnen Wurzelabschnitten (Abbildung 3-11 B) wurde PdHAK5 in Kontrollpflanzen überwiegend in den oberen Wurzelabschnitten exprimiert (Abbildung 3-12 C, W1-W3) und nur sehr gering in der Wurzelspitze. Darüber hinaus hatte die Salzbehandlung einen negativen Effekt auf die Expression von PdHAK5 (Abbildung 3-12 C), wohingegen die Expression des putativen Kaliumkanals PdKT1, wenn auch insgesamt geringer exprimiert als PdHAK5, salzunabhängig und in allen untersuchten Abschnitten vergleichbar hoch war (Abbildung 3-12 D). Somit hatte Salzstress auf die Expression beider Kalium-Transportproteine einen eher aus salzsensitiven Pflanzen bekannten Effekt. So wurde in salztoleranten Reis-Kultivaren und dem halophytischen Eiskraut eine Reprimierung von AKT-Orthologen im Wurzelgewebe durch Salzstress nachgewiesen (Su et al. 2001; Gollack et al. 2003), während der negative Effekt von Salzstress auf die Expression von HAK5 auch in der sensitiven Arabidopsis nachgewiesen wurde. Diese Reaktionen werden unter anderem als ursächlich für die Abnahme des Kalium/Natrium-Verhältnisses und somit die Sensitivität von Arabidopsis gegenüber Salz diskutiert (Aleman et al. 2009a, b). Dies könnte auf mögliche funktionelle Unterschiede von PdHAK5 und PdKT1 zu den bereits charakterisierten pflanzlichen Mitgliedern der HAK/KUP/KT Familie hindeuten, was aber endgültig über elektrophysiologische Untersuchungen aufgeklärt werden muss.

Zusammengefasst zeigten die flammenphotometrischen Messungen des Natriumgehalts, dass Dattelpalmen über einen effizienten Mechanismus des Natriumausschlusses verfügen und das Expressionsmuster von SOS1 legt, wie in anderen toleranten Arten, eine Beteiligung dieses Na^+/H^+ -Antiporters an diesem Ausschluss nahe. Aber obwohl keine negativen Auswirkungen des Salzstress auf den Kaliumhaushalt der Palmen festzustellen waren, zeigte sich das Expressionsprofil der beiden Kalium-Transportproteine für eine salztolerante Art eher untypisch.

3.3.4 Salzaufnahme und Lokalisation in *Chenopodium quinoa*

Auch *C. quinoa* (*Amaranthaceae*) ist verglichen mit zum Beispiel Weizen oder Mais eine salztolerante Nutzpflanze (Hariadi et al. 2011). Einige Studien konnten sogar einen positiven Einfluss auf das Wachstum bei einer Bewässerung mit 100mM NaCl feststellen (Geissler et al. 2009; Hariadi et al. 2011).

In den hier durchgeführten Untersuchungen führte die Behandlung mit 200mM NaCl für fünf Wochen zu reduziertem Wachstum (Abbildung 3-13). Trotzdem zeigten diese Pflanzen eine hohe Salztoleranz. Sie erreichten die Blüte und produzierten erfolgreich Samen. Wie viele andere Vertreter dieser Gattung besitzt auch *C. quinoa* epidermale Blasenhaare (englisch: *epidermal bladder cells*, kurz EBC). Diese riesigen, ballonartigen Zellen mit ihrer großen Vakuole werden seit längerem als externe Salzspeicher und damit als Schlüsselmerkmal der Salztoleranz dieser Arten diskutiert (Shabala et al. 2014; Kiani-Pouya et al. 2017).



Abbildung 3-13: Effekt einer fünfwöchigen Bewässerung mit 200mM NaCl auf das Wachstum von *C. quinoa*

200mM Salzbehandlung führten nur zu einer leichten Verringerung der Wuchshöhe im Vergleich zur Kontrolle. Die gestressten Pflanzen erreichten die Blüte und produzierten Samen. Abgebildet sind zwei repräsentative Pflanzen.

Daher wurde für die flammenphotometrische Bestimmung des Natriumgehaltes besonderes Augenmerk auf die EBCs gelegt. Da nur juvenile Blätter eine hohe Dichte an intakten EBCs aufweisen (Orsini et al. 2011), wurde der Na⁺- und K⁺-Gehalt von juvenilen Blättern ohne EBCs (juv. Blatt – EBCs), von welchen die EBCs unmittelbar vor der Probenahme entfernt wurden, sowie isolierten EBCs (EBC) bestimmt (Abbildung 3-14 A und B). Um auch einen Einblick in die Rolle der EBCs als externe Salzspeicher adulter Blätter zu gewinnen, wurde zwischen adulten Blättern mit EBCs (adult Blatt + EBCs) und adulten Blättern ohne EBCs (adult Blatt - EBCs) unterschieden. Auch hierzu wurden die EBCs unmittelbar vor der Messung entfernt (siehe 2.2.1).

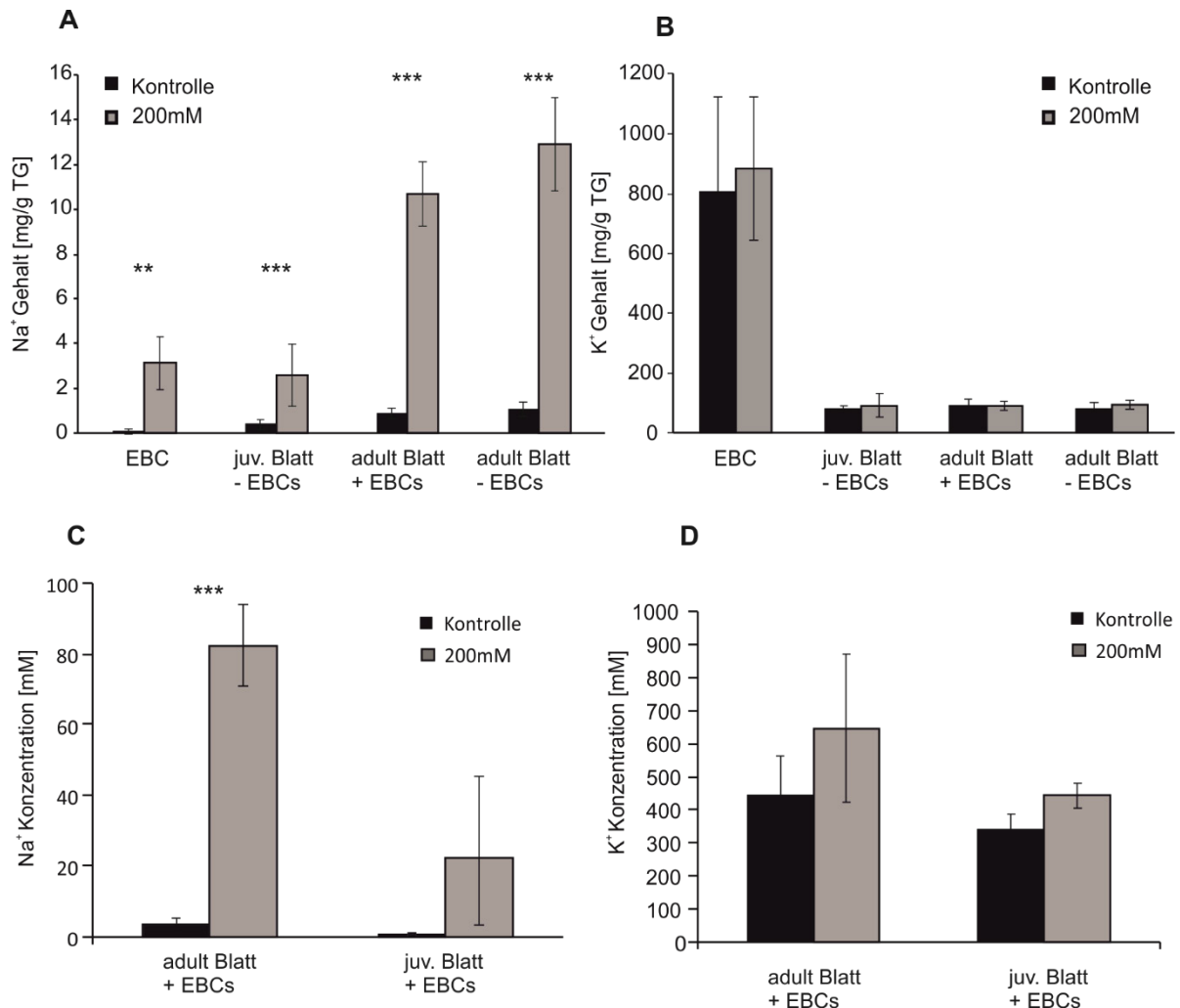


Abbildung 3-14: Natrium- und Kalium-Gehalt in EBCs und Blättern von *Chenopodium quinoa*

Die Pflanzen wurden für vier Wochen mit 200mM NaCl gegossen und die Natrium- und Kaliumkonzentration des Trockenmaterials (A und B) sowie von Pflanzen-Presssaft (C und D) wurde flammenphotometrisch bestimmt.

(A) Der Natriumgehalt bezogen auf das TG der salzbehandelten Quinoas (grau) war in EBCs sowie allen Blattproben im Vergleich zur Kontrolle (schwarz) signifikant erhöht und in adulten Blättern salzbehandelter Pflanzen mit EBCs (+EBCs) sowie adulten Blättern bei denen die EBCs unmittelbar vor der Probenahme entfernt wurden (-EBCs) deutlich höher als in juvenilen (juv.).

(B) EBCs hatten unabhängig von der Salzbehandlung einen, im Vergleich zu den Blattproben, sehr hohen Kaliumgehalt (vierfach höher). Die Salzbehandlung hatte auch in den Blattproben keinen signifikanten Einfluss auf den Kaliumgehalt.

(C) Die Natriumkonzentration nahm nur im Presssaft von adulten Blättern salzbehandelter Quinoas signifikant zu, während die Natriumkonzentration der juvenilen Blätter statistisch nicht durch die Salzbehandlung beeinflusst war. (D) Die Kaliumkonzentration zeigte keine Veränderung im Vergleich zur Kontrolle und war in adulten und juvenilen Blättern vergleichbar. ($n \geq 5$, $Mw \pm Stabw$, signifikante Unterschiede zwischen Kontrollen und 200mM sind markiert als * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ und *** $p \leq 0,001$).

Mittels der flammenphotometrischen Messungen konnte eindeutig gezeigt werden, dass *C. quinoa* während vierwöchiger Bewässerung mit 200mM NaCl-Lösung Natrium in das Blattgewebe und die EBCs aufnimmt. Der Natriumgehalt bezogen auf das TG war für alle untersuchten Gewebe der Kontrollpflanzen (Abbildung 3-14 A, schwarz) sehr niedrig, wobei der Natriumgehalt in EBCs mit $0,1 \pm 0,1$ mg/g TG am niedrigsten und mit $0,9 \pm 0,2$ mg/g TG in adulten Blättern ohne EBCs am höchsten war. Durch die Salzbehandlung stieg der Natriumgehalt in EBCs und juvenilen Blättern ohne EBCs signifikant an, wobei die Akkumulation von Natrium in juvenilen Blättern ohne EBCs und isolierten EBCs vergleichbar war. Ein Teil des unter Salzstressbedingungen aufgenommenen Natriums wird also aus dem juvenilen Mesophyllgewebe in die intakten EBCs weitergeleitet. Der Natriumgehalt in adulten Blättern (sowohl mit als auch ohne EBCs) stieg durch die Bewässerung mit Salzwasser stärker an als in juvenilen Blättern oder EBCs. Dabei war die Zunahme im adulten Blattgewebe selbst (Abbildung 3-14 A, adult Blatt - EBC) mit $12,9 \pm 2$ mg/g TG am stärksten. Die EBCs adulter Quinoa Blätter sind nur noch zu einem geringen Prozentsatz intakt, weswegen die EBCs keine weiteren Ionen aufnehmen können.

Zusätzlich zur Messung des Na⁺-Gehalts des getrockneten Pflanzenmaterials wurde auch die Konzentration im Presssaft von juvenilen und adulten Quinoa Blättern bestimmt (Abbildung 3-14 C und D). Der grundsätzlich höhere Natriumgehalt adulter Blätter spiegelte sich auch in den Presssaftkonzentrationen wieder (Abbildung 3-14 C). Dabei war die Natriumkonzentration adulter Blätter schon unter Kontrollbedingungen fast vierfach höher als die juveniler Blätter. Interessanterweise war die Na⁺-Zunahme durch die Salzbehandlung nur bei adulten Blättern signifikant, nicht aber bei juvenilen. Da eine Aufnahme von Natrium häufig einen negativen Effekt auf den Kaliumgehalt von Pflanzenzellen hat (Shabala und Cuin 2008; Shabala und Pottosin 2014) und die Aufrechterhaltung des Kalium/Natrium-Verhältnis häufig als Schlüsselmerkmal für Salztoleranz bei Pflanzen gilt, wurde außerdem der Kaliumgehalt bezogen auf das TG sowie die Kaliumkonzentration im Presssaft untersucht.

Im Gegensatz zur Natriumkonzentration des Presssafts blieb die Kaliumkonzentration sowohl juveniler als auch adulter Quinoa Blätter trotz der Bewässerung mit NaCl konstant (Abbildung 3-14 D). Wie für pflanzliches Gewebe üblich, war die Kaliumkonzentration mit ca. 500mM deutlich höher als die Natriumkonzentration und war für juvenile und adulte Blätter vergleichbar. Auch der Kaliumgehalt bezogen auf das TG der Blattproben war mit ca. 80mg/g TG vergleichbar und es war keine signifikante Änderung durch die Salzbehandlung feststellbar (Abbildung 3-14, B). Allerdings war der Kaliumgehalt der EBCs mit ca. 800mg/g TG um ein zehnfaches höher als im Blattgewebe. Diese außergewöhnlich hohe Kaliumgehalt (80% der Trockenmasse) konnte auch unter Salzstressbedingungen gemessen werden. Ionengehalte

bezogen auf das Trockengewicht lassen aber wenig Rückschlüsse auf osmotische Gegebenheiten und Adaptationen an den Salzstress zu. Da die Herstellung von Presssaft aus isolierten EBCs sehr schwierig ist, wurde die theoretische Natrium- und Kaliumkonzentration des bei der Trocknung des Gewebes verdunsteten Wassers errechnet. Um die Zulässigkeit dieser Rechnung abschätzen zu können, wurden die errechneten Werte soweit möglich mit den reellen Messwerten verglichen (Tabelle 3-2).

Die errechneten und reellen Natrium- sowie Kaliumkonzentrationen des Presssaftes von adulten und juvenilen Blättern stimmten dabei weitgehend überein und lagen größenordnungsmäßig im selben Bereich (Tabelle 3-2). Die errechneten Natriumkonzentrationen der EBCs lagen im Bereich der Messwerte juveniler Blätter. Allerdings lag die errechnete Kaliumkonzentration mit ca. 1M unter Kontrollbedingungen und ca. 3M bei Salzstress weit über den sowohl gemessenen als auch errechneten Konzentrationen der juvenilen Blätter.

Tabelle 3-2: Vergleich errechneter und gemessener Natrium- und Kaliumkonzentrationen im Presssaft von *Chenopodium quinoa* Blättern.

Aus dem Kalium- und Natriumgehalt bezogen auf das TG (Abbildung 3-14) und der im Gewebe enthaltenen Wassermenge wurde die theoretische Konzentration im Presssaft adulter und juveniler Blätter sowie EBCs errechnet (siehe 2.2.1) und mit reellen Messwerten verglichen. Sowohl die errechneten Na⁺- als auch die errechneten K⁺-Konzentrationen lagen im Bereich der reellen Messwerte. Werte entsprechen Mw ± Stabw, n=5.

	Na ⁺ Konzentration [mM]				K ⁺ Konzentration [mM]			
	berechnet	gemessen	berechnet	gemessen	berechnet	gemessen	berechnet	gemessen
	Kontrolle		200mM		Kontrolle		200mM	
ad. Blatt	7 ± 4	4 ± 1	96 ± 28	82 ± 12	337 ± 194	442 ± 121	392 ± 164	646 ± 227
juv. Blatt	3 ± 2	1 ± 0	58 ± 13	22 ± 23	292 ± 84	339 ± 50	500 ± 184	441 ± 47
EBCs	0,4 ± 0,5	NA	23 ± 8	NA	1140±253	NA	3091±1194	NA

Da die EBCs nur sehr wenig Zytoplasma besitzen und der meiste Raum innerhalb der Zelle durch die sehr große Vakuole eingenommen wird (Reimann und Breckle 1988), ist davon auszugehen, dass sich ein großer Teil des Kaliums der EBCs in den Vakuolen befindet (Ahmad und Maathuis 2014). Die zytoplasmatische Kaliumkonzentration in Pflanzenzellen ist mit ca. 100 - 200mM typischerweise deutlich niedriger als die errechnete Konzentration für EBCs (Maathuis und Amtmann 1999; Marschner und Marschner 2011), während die Kaliumkonzentration in Vakuolen mit bis zu über 500mM deutlich höher sein kann und damit einen großen Anteil an der Turgorsteuerung von Pflanzenzellen hat (Ahmad und Maathuis 2014). Quinoa könnte sich demnach mithilfe dieser hohen Kaliumkonzentrationen osmotisch an das niedrige Wasserpotential des Bodens bei Salzstressbedingungen anpassen.

3.3.5 Expressionsänderungen in epidermalen Blasenhaaren von Quinoa unter Salzstress

Damit die EBCs als externe Salzspeicherorgane zum Schutz der jungen, photosynthetisch aktiven Blätter unter Salzstress fungieren können, muss Salz in die EBCs aufgenommen werden. Ein Modell der möglichen Transportwege und beteiligten Transportproteine wurde bereits veröffentlicht (Shabala et al. 2014) und die Natriumaufnahme in die EBCs junger Blätter unter Salzstressbedingungen konnte in der hier vorliegenden Studie anhand von flammenphotometrischen Bestimmungen des Natriumgehalts belegt werden (Abbildung 3-14). 2017 wurde von zwei Arbeitsgruppen nahezu zeitgleich das Genom von *C. quinoa* veröffentlicht (Jarvis et al. 2017; Zou et al. 2017), was die Basis für weiterführende Untersuchungen der molekularen Grundlagen der Toleranzmechanismen dieser Pflanzen schaffte. Trotzdem sind die molekularen Details, die der Salzspeicherfunktion der EBCs zugrunde liegen, bisher wenig untersucht. Daher wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Maxim Messerer vom Helmholtz-Zentrum München mittels mRNA-Sequenzierung das Transkriptom von EBCs und Blattgewebe unter Kontroll- und Salzstressbedingungen analysiert (siehe 2.5.4 und Böhm*, Messerer*, Müller* et al. 2018). Die bioinformatische Verarbeitung und Analyse der Rohdaten der mRNA-Sequenzierung wurde von Dr. Maxim Messerer (Helmholtz Zentrum München, Plant Genome and Systems Biology) durchgeführt.

Tabelle 3-3: Differenziell exprimierte Gene im Transkriptom der EBCs und Blätter von *C. quinoa*

Anzahl der differenziell exprimierten Gene von EBCs und Blattgewebe unter Kontroll- und Salzstressbedingungen sowie der prozentuale Anteil an der Gesamtzahl der exprimierten Gene (FDR \geq 0,005)

	EBC vs. Blatt	EBC K vs. EBC Salz	Blatt K vs. Blatt Salz	EBC Salz vs. Blatt Salz
Anzahl	16809	1702	1659	20608
% differenziell exprimiert	41,1%	4,2%	4,05%	50,4%

Bei der mRNA-Sequenzierung wurden insgesamt 40907 Transkripte signifikant exprimiert, was 74,8% des rund 1,5Mb großen Genoms von *C. quinoa* mit ca. 55000 Genen (Zou et al. 2017) umfasst. Bereits unter Kontrollbedingungen wies das Transkriptom von EBCs und Blattgewebe mit rund 41% eine sehr große Zahl von differenziell exprimierten Genen auf (Tabelle 3-3). Die Auswirkung der Salzbehandlung auf das Transkriptom waren dagegen überraschend gering. In EBCs sowie im Blattgewebe wurden jeweils nur ca. 1700 Transkripte durch die Salzbehandlung beeinflusst, was nur zu einer leichten Erhöhung der differenziell exprimierten Gene zwischen EBCs und Blattgewebe unter Salzstressbedingungen führte. Die

Salzbehandlung hatte demnach kaum Auswirkungen auf das Transkriptom der EBCs von Quinoa (Tabelle 3-3).

Da für die Beladung der EBCs mit Natrium und Chlorid Transportproteine von zentraler Wichtigkeit sind, wurden im Folgenden die Daten der RNA-Sequenzierung mit besonderem Augenmerk auf entsprechende Transkripte analysiert. Um darüber hinaus ein besseres Verständnis des Energiehaushalts sowie der in EBCs ablaufenden metabolischen Prozesse zu erlangen, wurde das Transkriptom der EBCs mit dem des Blattgewebes auch hinsichtlich solcher Transkripte verglichen.

3.3.5.1 Transportsysteme in EBCs von *C. quinoa*

Kürzlich konnte gezeigt werden, dass im Genom von Quinoa, verglichen mit ihren nahe verwandten aber salzsensitiven Arten Spinat (*Spinacia oleracea*) und Zuckerrübe (*Beta vulgaris*), eine Expansion von Genen stattgefunden hat, die am Ionen- und Nährstofftransport beteiligt sind (Zou et al. 2017). Bei erhöhten NaCl-Konzentrationen im Boden nimmt Quinoa über die Wurzeln vermehrt Natrium-Ionen auf. Diese werden über das Leitgewebe in die ganze Pflanze transportiert. Ein Teil des Natriums gelangt dabei auch in die EBCs junger Blätter. Gleichzeitig schafft es Quinoa, den für pflanzliches Gewebe sehr hohen Kaliumgehalt aufrecht zu erhalten (Abbildung 3-14) (Marschner und Marschner 2011). Welche Transportproteine die Natriumaufnahme und Verteilung im Detail vermitteln sollte durch qPCR-Messungen verschiedener Kandidaten aus der mRNA-Sequenzierung überprüft werden, die auch in anderen Arten mit deren Salztoleranz in Verbindung gebracht werden (Rus et al. 2001; Zhu 2003; Amtmann et al. 2005; Oh et al. 2009). Um darüber hinaus Einblicke in die Funktionalität der EBCs und deren Rolle als externe Salzspeicher zu erhalten, wurden die mRNA-Sequenzierungs-Daten nach Transportproteinen durchsucht, die differentiell zwischen EBCs und Blattgewebe exprimiert wurden.

Unter Kontrollbedingungen konnten in EBCs und Blattproben insgesamt 587 Transkripte einer Transportfunktion in der Plasmamembran oder dem Tonoplasten zugeordnet werden, wovon 344 differentiell exprimiert waren. Interessanterweise hatte Salzstress nur einen geringen Effekt auf die Anzahl der differentiell exprimierten, Ionentransporter-Gene und führte zu einer Erhöhung auf 368 differentiell exprimierter Gene. Die schon ohne Salzbelastung hohe Zahl an differentiell exprimierten Transportern deutete darauf hin, dass in Quinoa EBCs viele Ionentransporter-Gene konstitutiv an hohe Salzkonzentrationen angepasst sind und es daher keiner weiteren Anpassungen auf expressioneller Ebene bedarf (Tabelle S1 B Vergleich B/L, Anhang D (6.4)). Von den 344 unter Kontrollbedingungen zwischen Blatt und EBCs differentiell exprimierten Transportproteinen repräsentierten Aminosäuretransporter mit 20% die größte Gruppe, gefolgt von ABC-Transportern (16%) sowie Metall-Transportproteinen (12%)

(Abbildung 3-15). Außerdem war unter den differentiell exprimierten Transportproteinen eine auffällig große Anzahl von Zucker-Transportproteinen (10%), wovon rund die Hälfte in EBCs verglichen mit dem Blattgewebe deutlich induziert war.

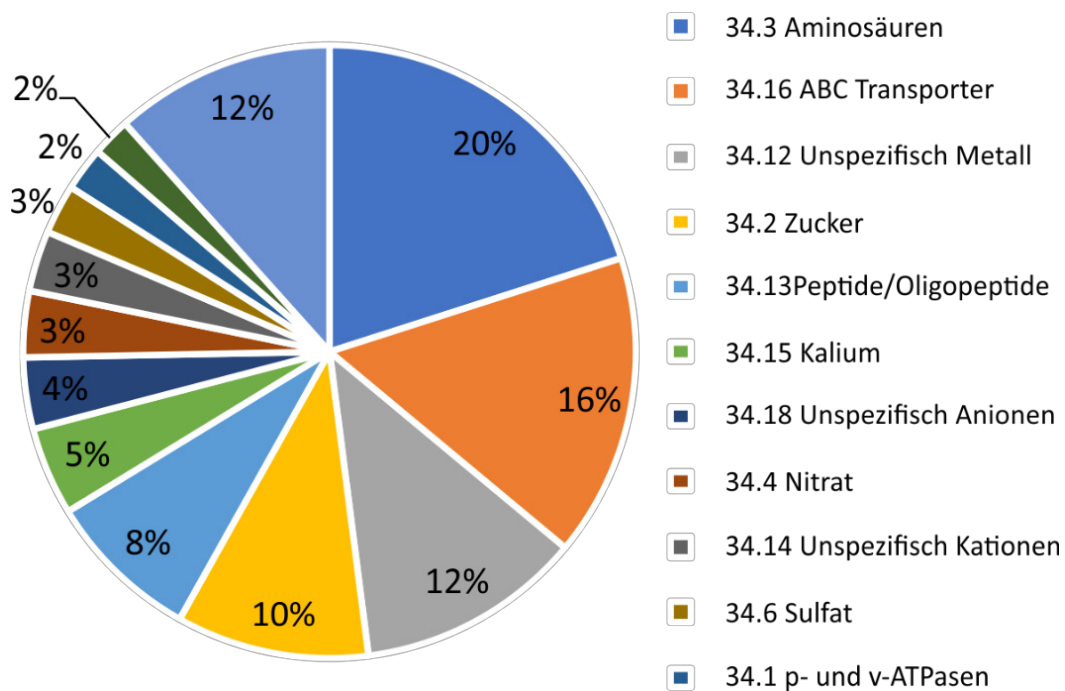


Abbildung 3-15: In EBCs von *C. quinoa* differentiell exprimierte Transportproteine

Prozentualer Anteil verschiedener Transportproteingruppen der in den mRNA-Sequenzierungen insgesamt 344 differentiell exprimierte Transportproteine unter Kontrollbedingungen (Tabelle S1 B, Anhang D (6.4)). Die Zahlen geben die MapMan Bin-Nummer an. FDR>0.005

Im Vergleich zu nahen verwandten, nicht salztoleranten Arten konnte im Quinoa Genom eine Vervielfältigung von Ionentransporter kodierenden Genen nachgewiesen werden (Zou et al. 2017). Solch eine Vervielfältigung scheint auch grundlegend für die Salztoleranz von *T. salsuginea* im Vergleich zu Arabidopsis zu sein (Wu et al. 2012). Eine vergleichende Studie konnte darüber hinaus eine stärkere Induktion von für die Salztoleranz relevanten Transportergenen in *T. parvula* als in der sensitiven Modellpflanze Arabidopsis nachweisen (Oh et al. 2010). Ob auch die Salztoleranz von Quinoa durch die Induktion solcher Gene vermittelt wird, sollte durch weitere Analysen der RNA-Sequenzierungsdaten geklärt werden.

Insgesamt ergab die RNA-Sequenzierung nur 75 Transkripte innerhalb der Transporter, die nur unter Salzstress, nicht aber unter Kontrollbedingungen differentiell in EBCs verglichen mit Blattgewebe exprimiert wurden und rund die Hälfte dieser Transkripte wurde in EBCs höher als in Blattgewebe exprimiert (Tabelle S1 C, Anhang D (6.4)). Die Expression der meisten Transporter-Gene in den EBCs von Quinoa scheint also bereits unter Kontrollbedingungen ausreichend hoch zu sein, um einen optimalen Ionentransport zu gewährleisten. Unter

Salzstressbedingungen fand nur für wenige, der möglicherweise an der Beladung der EBCs beteiligten Transporter-Gene eine Induktion statt. Besonders auffällig war daher die Induktion eines HAK-Orthologs (CCG000301.1) um rund das fünfzigfache in EBCs. Mitglieder der HAK/KUP/KT-Familie sind hochaffine Kaliumtransporter und die starke Induktion deutet auf eine Beteiligung an der Kaliumbeladung der EBCs unter Salzstress hin. Bereits unter Kontrollbedingungen fanden sich in EBCs 16 Kalium-Transporteure, darunter mehrere KUP-Orthologe, deutlich höher als im Blattgewebe exprimiert (Tabelle S1 B, Anhang D (6.4)).

Mitglieder der HKT1-Familie sowie der Na^+/H^+ -Antiporter SOS1 sind in anderen Pflanzen bereits als Hauptbestandteile des Natrium-Transportsystems beschrieben (Shi et al. 2002; Waters et al. 2013). Tatsächlich fanden sich innerhalb der Gruppe der in MapMan als unspezifischen Kationen-Transportproteine klassifizierten Transkripte vier als HKT1 annotierte Gene. Interessanterweise wurde CqHKT1 (CCG063895.1) stärker in EBCs als im Blatt exprimiert und schien darüber hinaus durch Salzstress induziert zu werden (Tabelle S1 B, Anhang D (6.4)). Darüber hinaus wurden drei verschiedene SOS1-Orthologe identifiziert, die alle im Blattgewebe höher als in EBCs exprimiert wurden (Tabelle S1 A, Anhang D (6.4)). Auffällig war außerdem die große Anzahl der Chlorid-Transportproteine innerhalb der differentiell exprimierten, bei MapMan als unspezifische Anionen-Transportproteine klassifizierten Transkripte (Abbildung 3-15 orange und Tabelle S1 B, Anhang D (6.4)).

Neben Plasmamembran lokalisierten Natrium-Transportproteinen werden auch Tonoplasten-Transportproteine der NHX-Familie mit Salztoleranz in Verbindung gebracht (Jiang et al. 2010; Bassil und Blumwald 2014). Im Arabidopsis Genom finden sich insgesamt acht Mitglieder dieser Familie (AtNHX1-8), welche hauptsächlich in der Plasmamembran, Vesikeln und dem Tonoplasten lokalisiert sind. Letztere transportieren Na^+ bzw. K^+ unter Nutzung des Protonengradienten in die Vakuolen (Bassil und Blumwald 2014). Das Transkriptom von EBCs und Blattgewebe wies insgesamt zehn als NHX annotierte Transkripte auf, von denen aber nur wenige in EBCs höher als im Blattgewebe exprimiert wurden (Tabelle S1 B und C, Anhang D (6.4)).

Die Beladung mit Natrium, Kalium und den notwendigen Gegen-Ionen findet zumindest teilweise entgegen der elektrochemischen Gradienten der jeweiligen Ionen statt und setzt damit eine polare Anordnung verschiedener, vor allem passiver Transportproteine voraus. Passive Transportproteine wie Kanäle können nur entlang des elektrochemischen Gradienten transportieren und würden sonst, bei ungünstigen Bedingungen den Ausstrom von Na^+ und Cl^- aus den EBCs vermitteln (Shabala et al. 2014). Das Expressionsmuster einiger in der RNA-Sequenzierung auffälliger Transkripte wurde mittels qPCR-Analysen weiter untersucht. Von besonderem Interesse waren dabei Na^+ - und K^+ -Transportproteine der HKT und KUP-Familie,

deren Beteiligung bereits an der Toleranz anderer Arten gegenüber Salzstress diskutiert wird (Aleman et al. 2009a; Waters et al. 2013; Shabala und Pottosin 2014). Zusätzlich wurde die Expression von Anionen-Transportproteinen mit einer vorausgesagten Chloridleitfähigkeit untersucht.

3.3.5.2 Natriumtransport

Die Funktion der EBCs als großvolumige Salzspeicher erfordert einen unidirektionalen Natriumtransport von den Epidermiszellen über die Stielzellen der Blasenhaare und schließlich in die EBCs selbst. In Pflanzen wird der Natriumtransport über die Plasmamembran hauptsächlich durch HKTs sowie den Na^+/H^+ -Antiporter SOS1 vermittelt (Uozumi et al. 2000; Shi et al. 2002; Apse und Blumwald 2007) und diese Transportproteine gelten auch in anderen Arten als Schlüssel zur Salztoleranz (Su et al. 2003; Oh et al. 2009; Dassanayake et al. 2011). So konnte ein Zusammenhang zwischen der Salztoleranz verschiedener Gerste-Varietäten und der genetischen Variation innerhalb des HKT1-Gens nachgewiesen werden (Qiu et al. 2011) und für die halophytische Art *T. salsuginea* konnte mittels SOS1 Knockdown-Mutanten eine wesentliche Rolle dieses Na^+/H^+ -Antiporters bei deren Salztoleranz nachgewiesen werden (Oh et al. 2007).

Auch im Transkriptom von Quinoa EBCs und Blättern konnten verschiedene SOS1- sowie HKT1-Orthologe identifiziert werden (Tabelle S1 A und B, Anhang D (6.4)). Um die Ergebnisse der mRNA-Sequenzierung zu verifizieren und weitere Einblicke in die Identität der Transportproteine, die die Natriumaufnahme über die Plasmamembran der EBCs vermitteln zu erhalten, wurde die Expression ausgewählter Transkripte mittels qPCR in einem unabhängigen Experiment genauer untersucht. Um auch mögliche Kandidaten zu identifizieren, die an der Aufnahme von Natrium und Chlorid über die Wurzeln beteiligt sein könnten, wurden zusätzlich zu den Blatt- und EBC-Proben auch Wurzelproben untersucht.

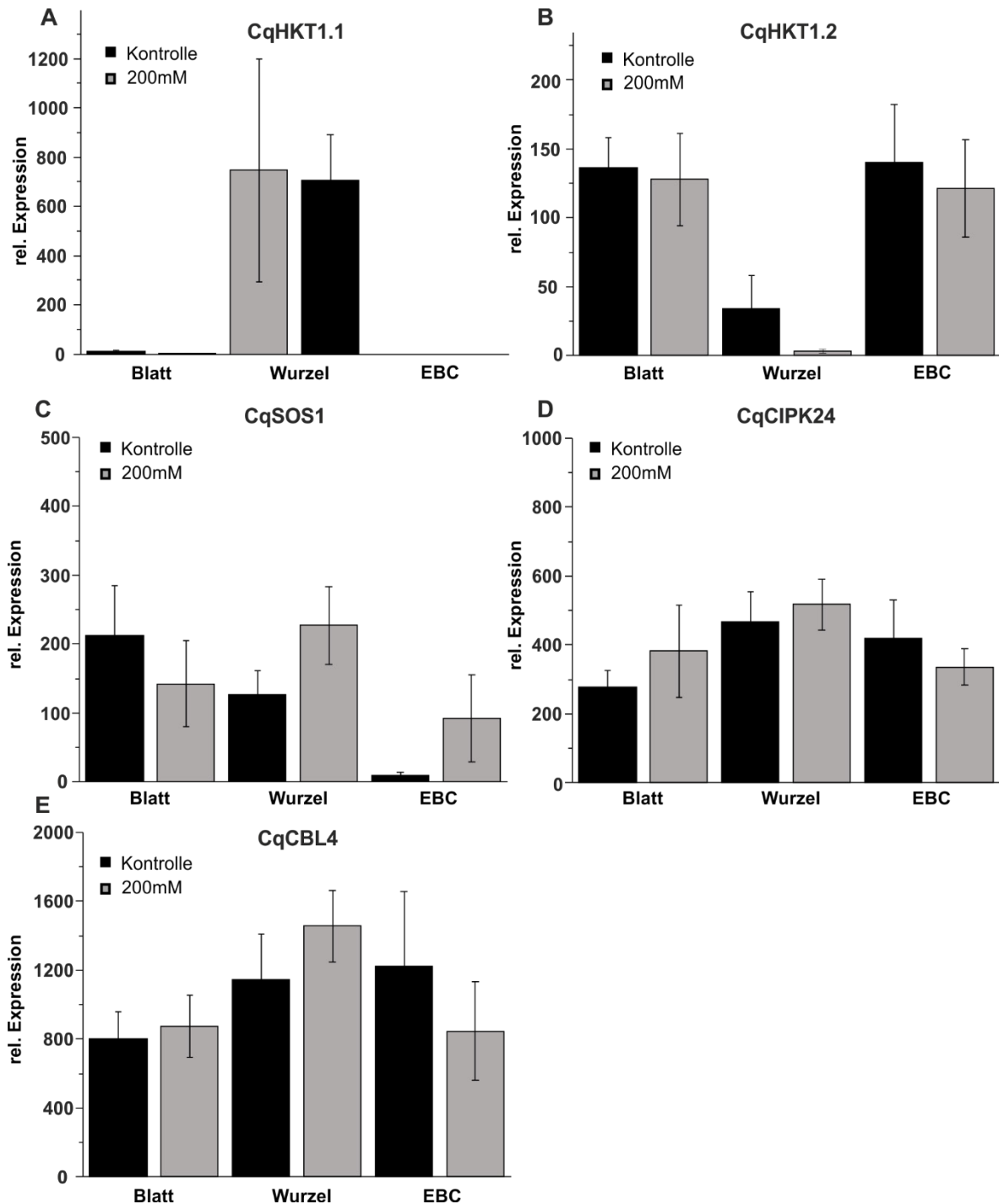


Abbildung 3-16: Expression von Natrium-Transportproteinen in *C. quinoa* Blattgewebe, Wurzeln und EBCs.

(A) CqHKT1.1 (CCG039537.1) wurde ausschließlich im Wurzelgewebe von Quinoa exprimiert. (B) CqHKT1.2 (CCG066375.1) wurde überwiegend in Blatt und EBCs exprimiert. (C) Der Na⁺/H⁺-Antiporter CqSOS1 (CCG057457.1/CCG038552.1) wurde salzunabhängig in Blatt und Wurzeln exprimiert, allerdings nur sehr schwach in EBCs. (D) Die SOS1-aktivierende CBL-interagierende Protein-Kinase CqCIPK24 (CCG019864.2) sowie (E) der kalziumabhängige Calcineurin-bindende Co-Faktor CBL4 (CCG048771.1) wurden in allen Geweben gleichermaßen exprimiert. Dargestellt sind die Ergebnisse aus qPCR-Messungen bezogen auf 10000 Moleküle des Housekeepinggens Ef1 α . n \geq 7, Mw \pm SE, signifikante Unterschiede zwischen Kontrollpflanzen (schwarz) und salzbehandelten (grau) sind markiert als * p \leq 0,05, ** p \leq 0,01 und *** p \leq 0,001.

Tatsächlich konnte die differentielle Expression zweier verschiedener HKT1-Orthologe aus Quinoa in verschiedenen Geweben nachgewiesen werden (Abbildung 3-16 A und B). Während CqHKT1.1 (CCG039537.1) ausschließlich in Wurzelgewebe nachgewiesen werden konnte, wurde ein anderes HKT1-Ortholog, CqHKT1.2 (CCG066375.1) hauptsächlich im Blatt und den EBCs exprimiert, was auf eine elementare Rolle von CqHKT1.2 bei der Natriumaufnahme in die EBCs über die Plasmamembran hindeutet. Auch die Expression eines SOS1-Orthologs, CqSOS1 (CCG057457.1/CCG038552.1) wurde hauptsächlich in Wurzeln sowie Blattgewebe, aber, passend zu der Funktion der EBCs als Salzspeicher, nur minimal in EBCs nachgewiesen (Abbildung 3-16 C). Diese Na⁺/H⁺-Antiporter fungieren aufgrund der elektrochemischen Gegebenheiten eher als Na⁺-Export System aus Zellen (Oh et al. 2009; Feki et al. 2011) und so würde CqSOS1 das bereits aufgenommene Natrium wieder aus den EBCs entlassen. In Arabidopsis und Weizen (*Triticum durum*) wird SOS1 über die CBL-interagierende Serin/Threonin-Proteinkinase 24 (CIPK24/SOS2) sowie CBL4 (SOS3) kalziumabhängig aktiviert (Qiu et al. 2002; Feki et al. 2011). Obwohl die Expression von CqSOS1 in EBCs verglichen mit Wurzel und Blattgewebe nur sehr gering war, waren die Transkriptzahlen von CqCIPK24 (SOS2; CCG019864.2) und CqCBL4 (SOS3; CCG048771.1) in EBCs auf ähnlichem Niveau wie in Wurzel- und Blattgewebe (Abbildung 3-16 D und E). Insgesamt zeigte sich die Expression aller am Natriumtransport beteiligten Transkripte in den qPCR-Messungen salzunabhängig (Abbildung 3-16 A bis E).

3.3.5.3 Chloridtransport

Um das Membranpotential aufrecht zu erhalten muss die Verschiebung von geladenen Teilen zwischen Zellen, Zellkompartimenten oder Zellen und dem Apoplasten elektrisch neutral sein. Da Salzstress neben erhöhten Natriumkonzentration meist auch mit erhöhten Chloridkonzentrationen einhergeht und bereits gezeigt wurde, dass Quinoa bei Salzstress neben Natrium auch Chlorid ins Blattgewebe aufnimmt (Orsini et al. 2011), wurden die Daten der RNA-Sequenzierung auch nach Anionen-Transportsystemen mit vorausgesagter Chloridleitfähigkeit durchsucht. Insgesamt wurden vier Vertreter der SLAC/SLAH-Familie, 97 Nitrat-Peptidtransporter (NPFs) sowie 23 Chloridtransporter vom CLC-Typ identifiziert, die grundsätzlich in EBCs exprimiert wurden (Tabelle S1 B, Anhang D (6.4)). Mitglieder der NPFs, zu welchen mittlerweile auch die NRT-Nitrattransporter gezählt werden (Leran et al. 2014) sowie die CLCs und die SLAC/SLAHs sind mögliche Kandidaten für die Aufnahme von Anionen und im Besonderen von Chlorid.

Da die Expression eines CLC-c (CCG018916.1/ CCG067813.1) sowie eines SLAH3 Orthologs (CCG055406.1/CCG044274.1) laut RNA-Sequenzierung in EBCs erhöht war (Tabelle S1 B, Anhang D (6.4)), wurde deren Expression zusätzlich mittels qPCR untersucht (Abbildung

3-17). Untersuchungen an anderen Arten deuteten für beide Chlorid-Transportproteine auf eine Funktion in der Anionenhomöostase bei Salzstress hin (Jossier et al. 2010; Henderson et al. 2014; Cubero-Font et al. 2016).

So zeigte sich in den qPCR-Untersuchungen die CqCLC-c Expression in EBCs rund acht Mal höher als im Blatt und Wurzeln und war in allen Geweben salzunabhängig (Abbildung 3-17 A). CqSLAH3 war verglichen, mit Blatt und Wurzeln, ebenfalls stark in EBCs exprimiert. Aber anders als bei CLC-c führte Salzstress bei SLAH3 zu einer Reprimierung der Expression im Blattgewebe und in Wurzeln, interessanterweise aber nicht in EBCs (Abbildung 3-17 B). So könnte CqSLAH3 einen Chloridtransport über die Plasmamembran der EBCs und CqCLC-c über den Tonoplasten vermitteln, der es Quinoa erlaubt bei Salzstress Chlorid als Gegenion zu Natrium in die EBCs aufzunehmen.

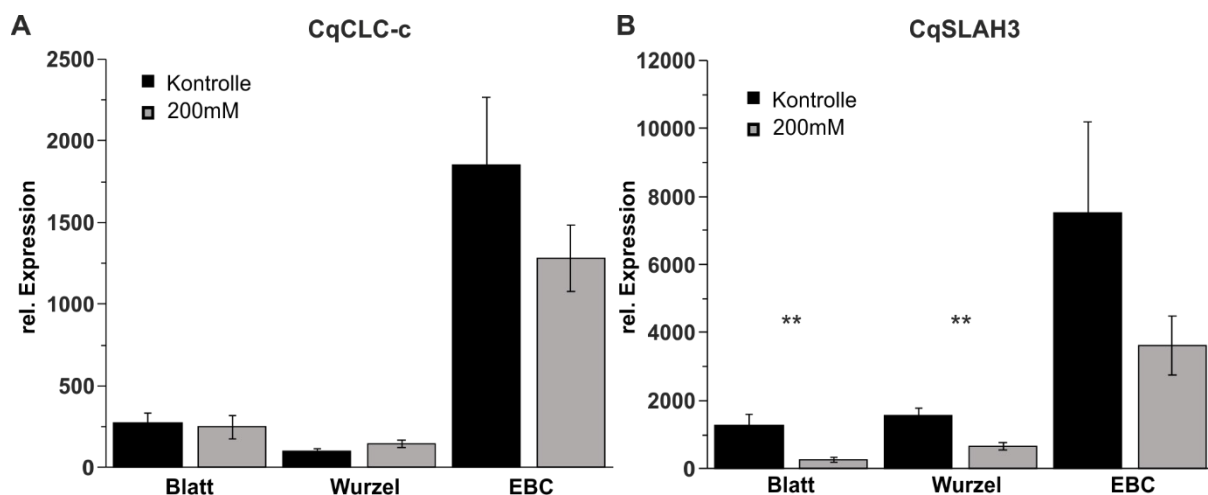


Abbildung 3-17: Expression von Chlorid-Transportproteinen in *C. quinoa*

(A) CqCLC-c (CCG018916.1/ CCG067813.1) war überwiegend in EBCs exprimiert und nur sehr gering in Wurzel und Blattgewebe. Salz hatte keinen Einfluss auf die Expression. (B) Auch die Expression von CqSLAH3 (CCG055406.1/CCG044274.1) war in EBCs am höchsten. In Blatt und Wurzelgewebe wurde die Expression durch die Salzbehandlung reprimiert. Dargestellt sind die Ergebnisse aus qPCR-Messungen bezogen auf 10000 Moleküle des Housekeepinggens *Ef1α*. $n \geq 7$, $Mw \pm SE$, signifikante Unterschiede zwischen Kontrollpflanzen (schwarz) und salzbehandelten (grau) sind markiert als * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ und *** $p \leq 0,001$.

3.3.5.4 Kaliumtransport und Osmoprotektion

Sowohl der Kaliumhaushalt als auch Osmoprotektion durch organische Verbindungen spielen bei der Salzstresstoleranz von Pflanzen eine große Rolle (siehe 1.5.3). Anhand der flammenphotometrischen Messungen des Kaliumgehalts konnte gezeigt werden, dass Salzstress bei Quinoa keinen negativen Effekt auf den bereits unter Kontrollbedingungen sehr hohen Kaliumgehalt hat (siehe 3.3.4). Deshalb wurde auch die Salzabhängigkeit ausgewählter Transkripte des Kaliumtransports sowie der Prolinhomöostase untersucht (Abbildung 3-18).

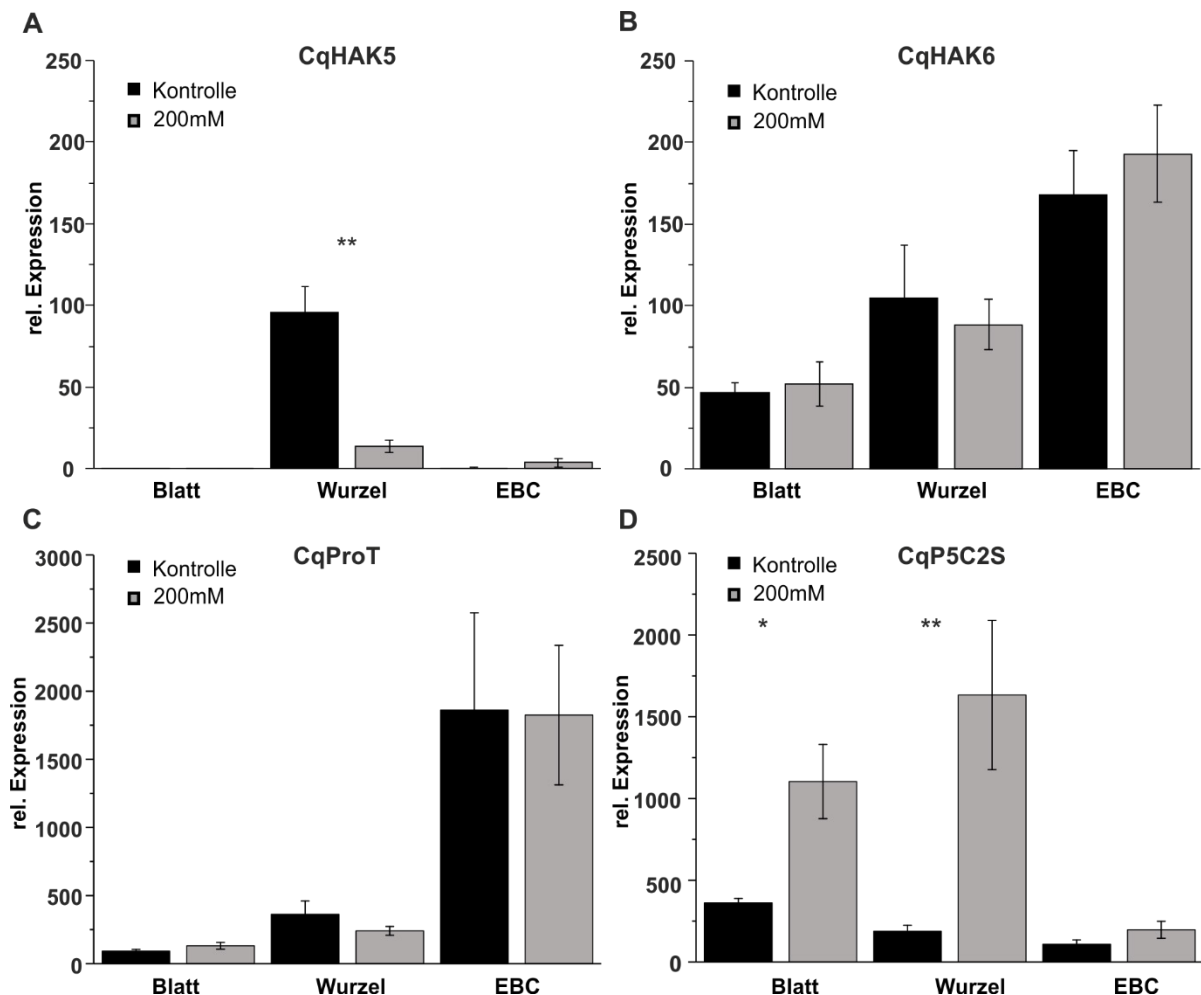


Abbildung 3-18: Effekt von Salzstress auf die gewebespezifische Expression von Kaliumtransportsystemen sowie an der Prolinhomöostase beteiligter Transkripte in *C. quinoa*

(A) CqHAK5 (CCG045154.1/ CCG044167.1) wurde unter Kontrollbedingungen und Salzbehandlung nur in Wurzeln exprimiert, wobei Salzstress einen negativen Effekt auf die Expression in Wurzeln hatte. (B) CqHAK6 (CCG024117.1) dagegen wurde salzunabhängig in allen Geweben, aber am stärksten in EBCs exprimiert. (C) Der Prolintransporter CqProT (TRINITY_DN108018) war stark in EBCs und niedrig in Wurzeln und Blattgewebe exprimiert. Salzstress hatte keinen Einfluss auf die Expression. (D) Im Gegensatz dazu wurden nur sehr wenige Transkripte der D1-Pyrrolin-5-Carboxylat Synthase CqP5CS2 (CCG065773.1) in EBCs unter Kontroll- und Salzstressbedingungen nachgewiesen. Allerdings wurde CqP5CS2 in Blatt und Wurzelgewebe durch Salz induziert.

Dargestellt sind die Ergebnisse aus qpCR-Messungen bezogen auf 10000 Moleküle des Housekeepinggens Ef1a. $n \geq 7$, $Mw \pm SE$, signifikante Unterschiede zwischen Kontrollpflanzen (schwarz) und salzbehandelten (grau) sind markiert als * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ und *** $p \leq 0,001$.

Dabei fanden sich zwei HAK-Orthologe, CqHAK5 und CqHAK6, mit deutlichen Unterschieden in ihren Expressionsmustern (Abbildung 3-18 A und B). CqHAK5 wurde ausschließlich in Wurzeln exprimiert, wohingegen CqHAK6 in allen Geweben, aber am stärksten in EBCs nachgewiesen werden konnte. Außerdem hatte die Salzbehandlung nur auf die Expression des Wurzel-exprimierten CqHAK5, nicht aber auf die von CqHAK6 in EBCs einen negativen Effekt. Der hohe Kaliumgehalt der Quinoas könnte also zumindest unter Kontrollbedingungen durch die hochaffine Kaliumaufnahme des in Wurzeln exprimierten CqHAK5 vermittelt werden. Die Translokation und Akkumulation von Kalium in oberirdische Gewebe einschließlich der EBCs mit ihrem sehr hohen Kaliumgehalt auch bei Salzstress könnte demnach durch HAK6 reguliert werden.

Kiani-Pouya und Kollegen konnten 2017 zeigen, dass Salzstress bei Quinoa wie in vielen anderen salztoleranten Arten auch (Szabados und Savoure 2010; Barkla und Vera-Estrella 2015) zu einer Erhöhung vieler kompatibler Solute führt, und dass vor allem der Prolingehalt massiv zunimmt. Eine Studie über die Auswirkungen von Salzstress auf das Metabolom der EBCs von *M. crystallinum* konnte einen Anstieg der Prolinkonzentration in den EBCs selbst nachweisen (Barkla und Vera-Estrella 2015). Tatsächlich wurden mittels RNA-Sequenzierung in EBCs und Blattgewebe neben mehreren putativen Prolintransportern (ProT) auch drei Orthologe der D1-Pyrrolin-5-Carboxylat Synthase (P5CS) identifiziert, die den limitierenden Schritt in der Prolinsynthese katalysieren (Tabelle S1 A, Anhang D (6.4)). Anhand der qPCR-Messungen konnte die starke, salzunabhängige Expression eines ProT in EBCs nachgewiesen werden (Abbildung 3-18 C). Darüber hinaus wurde die Expression von P5CS2 in Blatt und Wurzeln durch die Salzbehandlung induziert, nicht aber in EBCs selbst (Abbildung 3-18 D). Zusammengenommen deutet dies darauf hin, dass der Anstieg von Prolin in EBCs durch Salzstress eher auf einer gesteigerten Importrate von Prolin durch CqProT aus dem Blattgewebe basiert, als auf einer erhöhten Syntheserate in den EBCs selbst.

Die Synthese von Aminosäuren wie Prolin ist ein energieaufwändiger, ATP und NADPH zehrender Prozess (Lehmann et al. 2010). Auch viele der Transkripte, die möglicherweise die Aufnahme von Natrium, Kalium und Chlorid in EBCs bzw. die Vakuolen vermitteln, sind (sekundär) aktive Transporter (Tabelle S1 A, Anhang D (6.4), Abbildung 3-16 bis Abbildung 3-18). Bislang ist über den Energiehaushalt der EBCs von Quinoa aber wenig bekannt und im Folgenden wurden daher die Ergebnisse der RNA-Sequenzierung nach Auffälligkeiten in grundlegenden Stoffwechselwegen durchsucht.

3.3.6 Im Transkriptom von EBCs dominieren katabole Stoffwechselwege

Für die EBCs von *M. crystallinum* konnte bereits gezeigt werden, dass diese weit mehr als nur passive Speicherorgane für Ionen sind, sondern hochspezialisierte Zellen, die stark metabolisch aktiv sind (Barkla et al. 2016). Die Analysen der RNA-Sequenzierungsdaten der EBCs von Quinoa zeigten, dass sich auch das Transkriptom der Quinoa-EBCs in vielen wesentlichen Stoffwechselprozessen von dem des Blattgewebes unterscheidet (Tabelle 3-4).

Insgesamt war die Mehrheit der Transkripte, die katabolischen Prozessen wie dem Citrat-Zyklus oder dem Fettsäurestoffwechsel zugeordnet werden können, in EBCs im Vergleich zum Blattgewebe deutlich erhöht (Tabelle 3-4). Innerhalb des Fettsäurestoffwechsels war die große Anzahl von an der Kutikula-Biosynthese beteiligten Genen besonders auffällig (Tabelle S1 A Anhang D (6.4)). So wurden beispielsweise vier Orthologe von AtCER8 deutlich höher in EBCs als im Blattgewebe exprimiert, was auf eine hohe Kutikula-Syntheserate der EBCs zum Schutz vor Verdunstung schließen lässt. Gleichzeitig waren dagegen anabole Stoffwechselwege, wie Photosynthese und Pentose-Phosphat-Zyklus (inklusive Calvin-Zyklus) in EBCs eher unterrepräsentiert (Tabelle 3-4).

Tabelle 3-4: Übersicht differentiell regulierter Stoffwechselwege in EBCs von Quinoa

Prozentualer Anteil differentiell und nicht differentiell exprimierter Gene verschiedener Stoffwechselwege an der Gesamtheit der gefundenen Transkripte in EBCs verglichen zum Blattgewebe unter Kontrollbedingungen.

Stoffwechselweg	Anzahl Transkripte	Nicht differentiell exprimiert (%)	induziert in EBCs (%)	reprimiert in EBCs (%)
Photosynthese (Anabolismus)	77	16	6	78
Pentose-Phosphat Zyklus (Anabolismus)	37	43	11	46
Citrat Zyklus (Katabolismus)	30	47	37	17
Fettsäure-Stoffwechsel (Katabolismus)	33	33	55	12

Barkla und Kollegen konnten im Jahr 2016 photosynthetisch aktive Chloroplasten in den EBCs der fakultativen CAM-Pflanze *M. crystallinum* nachweisen und auch die EBCs von Quinoa enthalten Chloroplasten (Böhm*;Messerer*,Müller* et al. 2018), weshalb die Transkriptom-Daten der EBCs im Folgenden mit besonderem Augenmerk auf Photosynthese-assoziierte Gene analysiert wurden.

Von den insgesamt rund 40 dem Pentose-Phosphat Zyklus zugeordneten Genen einschließlich denen des Calvin-Zyklus waren 46% im Blattgewebe höher als in EBCs exprimiert (Tabelle 3-4). Zusammen mit der großen Anzahl der in EBCs stark exprimierten putativen Zuckertransporter (Abbildung 3-15 und Tabelle S1 B, Anhang D (6.4)) deutete dies auf eine erhöhte Importrate von Zuckern aus dem Blattgewebe in die EBCs und damit auf eine geringe Zuckersyntheserate der EBCs selbst zur Energiegewinnung hin.

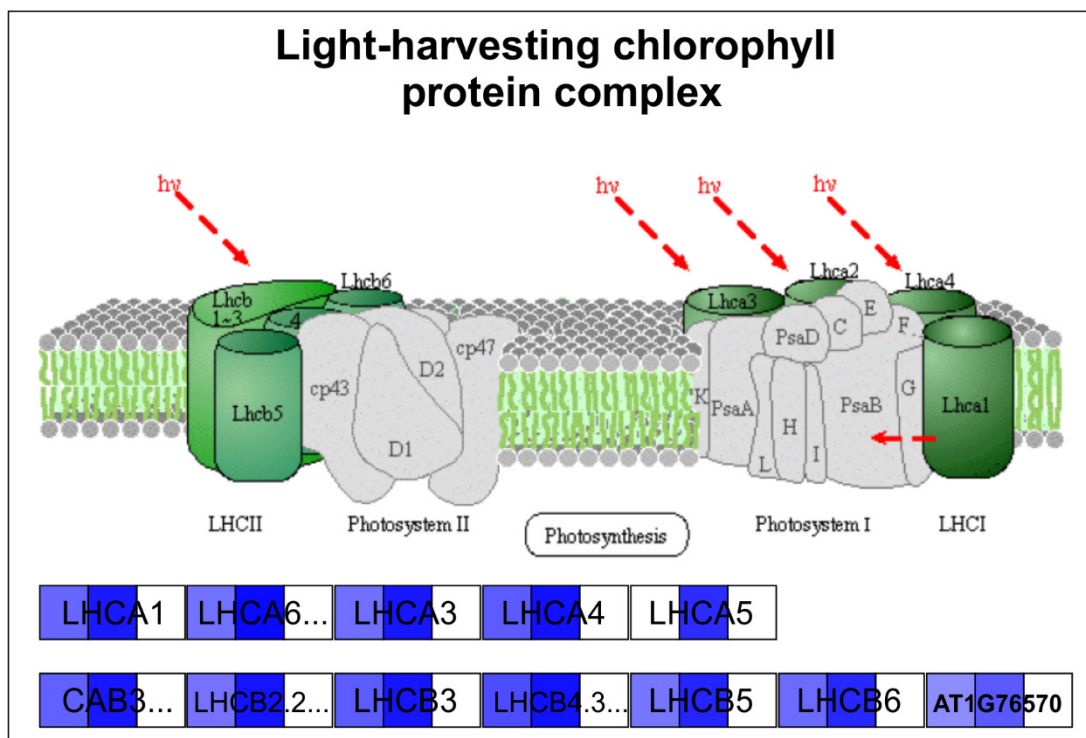


Abbildung 3-19: Differentielle Expression von Lichtsammelkomplex-Proteinen in EBCs und Blattgewebe von *C. quinoa*

Relative Expression von Lichtsammelkomplex-Genen in EBCs und Blattgewebe. Dargestellt sind EBC vs. Blatt unter Kontrollbedingungen (erste Box), salzgestresste EBCs vs. salzgestresstes Blattgewebe (zweite Box) sowie salzgestresste EBCs vs. Kontroll-EBCs (dritte Box). Weiße Boxen bedeuten keinen Unterschied zwischen den verglichenen Geweben/Behandlungen an. Blaue Boxen deuten auf ein niedrigeres Expressionsniveau in EBCs hin. Je höher die Intensität des Blautons, desto größer der Unterschied. Die Abbildung wurde aus den fc-Werten der Ergebnisse der RNA-Sequenzierung mit Paintomics (www.paintomics.org) von Dr. Maxim Messerer erstellt. LHCA= Light harvesting complex Gen des PSI, LHCB= Light harvesting complex des PSII, CAB3=Chlorophyll a/b bindendes Protein, At1G76570= Light-Harvesting complex B7

EM-Aufnahmen der Chloroplasten in EBCs von Quinoa zeigten nur wenige Granastapel (Böhm*, Messerer*, Müller* et al. 2018) und schon früh konnte gezieht werden, dass das Photosystem I zusammen mit LHCI und ATP-Synthasen vermehrt in ungestapelten Stromamembranen vorkommen, wohingegen das Photosystem II und die Komponenten des LHC II hauptsächlich in den gestapelten Granamembranen lokalisiert sind (Armond et al. 1977; Anderson und Melis 1983; Boekema et al. 2000). Die wenigen Granastapel der Chloroplasten der Quinoa-EBCs führten zu der Idee, dass in den EBCs vornehmlich PS I zur Deckung des hohen Energiebedarfs benutzt wird (Böhm*, Messerer*, Müller* et al. 2018). Insgesamt konnten 77 Transkripte der in den Thylakoidmembranen der Chloroplasten stattfindenden Lichtreaktion der Photosynthese zugeordnet werden (Tabelle S1 A, Anhang D (6.4)) und 78% dieser Gene waren in EBCs niedriger exprimiert als im Blattgewebe (Tabelle 3-4). Allerdings waren sowohl dem Photosystem I zugeordnete, in Granamembranen lokalisierte Komponenten als auch Komponenten des Photosystems II in EBCs niedriger exprimiert (Abbildung 3-19 erster und zweiter Kasten). Dabei hatte die Salzbehandlung keinen Einfluss auf die Expressionsstärke der verschiedenen Photosystem-Komponenten in EBCs (Abbildung 3-19, dritter Kasten).

Zusammengefasst deuten auch diese Unterschiede auf eine eher heterotrophe Natur der EBCs hin, in denen Photosynthese bei der Energiegewinnung eine untergeordnete Rolle zu spielen scheint und deren Energiebedarf vermehrt über katabole Prozesse und nicht hauptsächlich durch Photosynthese gedeckt zu werden scheint.

4. Diskussion

Als sessile Organismen sind Pflanzen variierenden Umweltbedingungen ausgesetzt. Erreichen diese besonders extreme Ausmaße, können weniger toleranter Arten sich nicht mehr anpassen und durch den daraus resultierenden Stress kommt es zu vermindertem Wachstum bis hin zum Absterben der Pflanzen. Durch den fortschreitenden Klimawandel treten immer öfter extreme Bedingungen wie Hitze, Trockenheit und Überflutungen auf. 2018 führte die extreme Trockenheit gepaart mit den sehr hohen Temperaturen allein in Deutschland zu Ernteaussfällen von rund 2 Mrd. Euro (Janson 2018). Durch die starke Bewässerung von landwirtschaftlichen Nutzflächen besonders in ariden Gebieten kommt es darüber hinaus auch zunehmend zur Versalzung der Böden (FAO 2011). Aufgrund weltweit steigender Bevölkerungszahlen ist aber eine Erhöhung der globalen Nahrungsmittelproduktion notwendig. Neue landwirtschaftlich nutzbare Flächen sind allerdings begrenzt. Um also die erhöhte Nachfrage nach Nahrungsmitteln auch zukünftig decken zu können, müssen vor allem Trocken- und Salzstress resistente Pflanzen angebaut werden. Dies kann sowohl durch den Anbau grundsätzlich toleranter Nutzpflanzenarten, die gezielte Züchtung toleranter Varietäten bereits heute genutzter Pflanzen sowie die gentechnische Optimierung von Nutzpflanzen erreicht werden (Godfray et al. 2010; Geissler et al. 2014; Godfray und Garnett 2014).

Die Toleranz von Pflanzen gegenüber externen Stressfaktoren beruht auf der genetisch bedingten Fähigkeit zur Anpassung an Stressbedingungen, die es den Pflanzen erlaubt, trotz ungünstiger Umweltbedingungen einen Stoffwechsel aufrecht zu erhalten, der weiteres Wachstum und Reproduktion zulässt (Peleg et al. 2011). Diese Anpassungen sind sehr komplex und beinhalten abhängig von der Natur des Stresses eine Kombination aus verschiedenen physiologischen und biochemischen Mechanismen, sowohl auf zellulärer als auch auf Pflanzenebene (Munns und Tester 2008; Peleg et al. 2011). Im Allgemeinen weisen tolerante Pflanzen ein größeres Vermögen zur Adaption als nicht tolerante auf. Häufig nutzen tolerante Arten aber ähnliche Mechanismen zur Anpassung an ungünstige Umweltbedingungen wie weniger tolerante Arten und die erhöhte Toleranz dieser Arten wird durch eine höhere Effizienz der Adaption oder durch das gleichzeitige Vorhandensein weiterer Mechanismen erreicht (Bromham, 2015; Chang et al. 2016). Die Kenntnis von solchen, generell in höheren Pflanzen vorkommenden Strategien zur Adaption an bestimmte Stressfaktoren sind daher wichtig. Durch die Forschung an der Modellpflanze Arabidopsis und deren für Pflanzen bislang einzigartige Verfügbarkeit von Mutanten wurden bereits große Fortschritte in unserem Verständnis von grundlegender Pflanzenphysiologie und der Anpassungsstrategien von Pflanzen an bspw. Hitze-, Salz- oder Trockenstress erzielt, die auch auf andere Arten übertragbar sind (Provart et al. 2016). Ein prominentes Beispiel für

einen zwar überwiegend in Arabidopsis erforschten, aber in allen bislang untersuchten höheren Landpflanzen vorkommenden Mechanismus, um den Wasserhaushalt zu regulieren und sich so zum Beispiel an Trockenstress anzupassen, ist der ABA-induzierte Stomaschluss. Und obwohl mittlerweile zahlreiche Details der ABA-Signalkaskade in Schließzellen, die zum Stomaschluss führen, bekannt sind, weiß man über die spezifischen Funktionen der sechs in Arabidopsis Schließzellen vorkommenden ABA-Rezeptoren der PYR/PYL-Familie nur wenig (siehe 1.3.3 bis 1.3.5). In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb mit Hilfe von verschiedenen ABA-Rezeptormutanten der Modellpflanze Arabidopsis die funktionelle Spezifität einzelner ABA-Rezeptoren untersucht. Die Forschung an Arabidopsis allein ist aber nicht ausreichend, um spezifische Eigenschaften toleranter Arten zu identifizieren (Chang et al. 2016). Im Rahmen dieser Arbeit wurde deshalb beispielhaft auch die Stomareaktion der trockenoleranten Dattelpalme auf Licht und ABA mit der von Arabidopsis verglichen, um so Besonderheiten in der Stoma-Physiologie, dieser an besonders extreme Standorte angepassten Pflanzen zu identifizieren.

Arabidopsis ist außerdem eine besonders salzsensitive Pflanze und auch wenn viele Adaptionsmechanismen an Salzstress in höheren Pflanzen konserviert sind, haben sich salztolerante Arten zusätzlich regulatorisch und/oder morphologisch an diesen Stress angepasst (Cushman und Bohnert 2000). Kurzzeitiger, relativ milder Salzstress (rund 100mM) führt bei Arabidopsis bereits zum Absterben (Aleman et al. 2009b; Orsini et al. 2010). Dattelpalmen wachsen dagegen natürlicherweise an sehr salzigen Standorten, wie bspw. an den Küsten von Saudi-Arabien. Sie tolerieren NaCl bis hin zu Meerwasserkonzentrationen (Zaid und de Wet 2002), ohne jedoch besondere Strukturen zur Salzabgabe wie beispielsweise Salzdrüsen, aufzuweisen. Auch Quinoa weist eine im Vergleich zu Arabidopsis sehr hohe Toleranz gegenüber Salzstress auf. Diese beruht aber zumindest anteilig auf der Ausbildung der epidermalen Blasenhaare auf den Blattoberflächen, die als externe Salzspeicher genutzt werden (Ruiz et al. 2016; Kiani-Pouya et al. 2017). In dieser Arbeit wurden verschiedene Aspekte der Salztoleranz von sowohl Dattelpalmen als auch Quinoa bearbeitet. Zum einen wurde die Aufnahme von Natrium in beiden Arten untersucht, wobei der Schwerpunkt bei Quinoa auf den EBCs und bei der Dattelpalme auf dem Wurzelgewebe lag. Zum anderen wurden expressionelle Auswirkungen des Salzstress in EBCs von Quinoa sowie dem Wurzelgewebe von Dattelpalmen untersucht. Dadurch sollten die an der Beladung der EBCs beteiligten Transportproteine aber auch die an der Natriumhomöostase von Dattelpalmen beteiligten Transportproteine identifiziert werden.

Aufgrund der Diversität der in dieser Arbeit behandelten Aspekte der Stresstoleranz von Pflanzen, werden diese im Folgenden separat diskutiert.

4.1 ABA-Rezeptoren in Schließzellen von *Arabidopsis thaliana*

Eine entscheidende Rolle beim Stomaschluss von Pflanzen spielt das Stresshormon ABA. Dabei wird nicht nur der Stomaschluss durch Trockenstress über die Wurzeln durch den ABA-Signalweg vermittelt, sondern auch der Stomaschluss als Reaktion auf Änderungen der relativen Luftfeuchte sowie des atmosphärischen CO₂-Gehaltes wird zumindest teilweise durch wesentliche Komponenten des ABA-Signalwegs induziert (Bauer et al. 2013; Chater et al. 2015). Die Schließzellantworten auf diese verschiedenen Reize unterschieden sich allerdings auch teilweise, vor allem auf genexpressioneller Ebene von voneinander (siehe 1.3.4). Neben MAP-Kinasen (Danquah et al. 2015) und Phosphatasen werden auch die ABA-Rezeptoren der PYR/PYL-Familie als mögliche Divergenzpunkte zwischen den einzelnen Signalwegen diskutiert. Die gleichzeitige Expression von mehreren Mitgliedern der PYR/PYL-Familie in den hochspezialisierten Schließzellen, könnte auf distinkte, nicht vollständig redundante Funktionen der ABA-Rezeptoren hindeuten. Im ersten Teil dieser Arbeit sollten daher funktionelle Unterschiede zwischen den PYR/PYL-Rezeptoren identifiziert werden.

Mindestens sechs der 14 in *Arabidopsis* vorkommenden ABA-Rezeptoren der PYR/PYL-Familie werden in Schließzellen exprimiert (Gonzalez-Guzman et al. 2012). *Arabidopsis* vierfach und fünffach Verlustmutanten dieser ABA-Rezeptoren weisen im Stomaschluss eine deutlich verminderte Sensitivität gegenüber CO₂, Luftfeuchte und Ozon auf und haben grundsätzlich eine erhöhte stomatare Leitfähigkeit (Merilo et al. 2013; Chater et al. 2015; Hsu et al. 2018). Dies verdeutlicht bereits die wichtige Rolle der Rezeptoren bei der Regulation der Transpiration. Allerdings konnten den Schließzell ABA-Rezeptoren bis heute außer der ABA-Signalweiterleitung keine spezifischen Aufgaben zugeordnet werden. Bioinformatische Analysen des Schließzell-Transkriptoms von *Arabidopsis* deuteten aber an, dass die PYR/PYLs auch an der Signaltransduktion der Stomaschluss-Signale Luftfeuchte, CO₂ und Licht beteiligt sind und dass jeder dieser Reize Einfluss auf die Expression eines distinkten Sets an Rezeptoren hat (Tabelle 3-1) (Bauer et al. 2013). Deshalb wurden in dieser Studie die Änderungen der Transpirationsraten diverser Rezeptormutanten auf verschiedene Reize hin untersucht. Dabei konnten erstmals grundlegende funktionelle Unterschiede der einzelnen Rezeptoren in Schließzellen nachgewiesen werden.

4.1.1 ABA und CO₂

Grundsätzlich wurde auch in dieser Studie bei Gaswechsellmessungen eine erhöhte Transpiration der 12458-Verlustmutante (PYL1 vorhanden) unter Standardbedingungen beobachtet (Abbildung 3-1, weiß). Um funktionelle Unterschiede der einzelnen Rezeptoren zu identifizieren, wurde die Transpiration der jeweiligen Komplementationslinien mit PYR1, PYL2, 4 und 5 im 12458-Hintergrund untersucht. Interessanterweise konnte nur die Komplementation mit PYL5 die Grundtranspirationsrate auf den Wert der Wildtyp Pflanzen senken (Abbildung 3-1, orange), was auf eine übergeordnete Rolle dieses ABA-Rezeptors an der Regulation der Stomaweite bereits unter normalen, nicht-stressigen Bedingungen hindeutet. Die Komplementation von PYL2 in die 12458-Verlustmutante führte zwar auch zu einer tendenziellen Abnahme der Transpiration, diese war allerdings verglichen mit der 12458-Verlustmutante nicht signifikant. Aber zusammen mit der Tatsache, dass auch die Grundtranspiration der anderen fünffach Verlustmutante, der 11458, in der PYL2 nativ vorhanden ist, von vorn herein vergleichbar mit der der Wildtyp-Pflanzen war, deutet dies darauf hin, dass auch PYL2 wichtig für die Regulierung der Grund-Stomaweite ist. Der Rezeptor PYL2 war außerdem der einzige der untersuchten Rezeptoren, der die fehlende ABA-Sensitivität der 12458-Verlustmutante vollständig wiederherstellen konnte. Wurden Blätter von Wildtyp-Pflanzen für 1h mit 50µM ± ABA im Dunkeln inkubiert, führte eine anschließende Beleuchtung nicht zur Öffnung der Stomata (Abbildung 3-2). In PYR1 komplementierten Pflanzen führte die Beleuchtung nach ABA-Vorinkubation nur zu einer teilweisen Öffnung der Stomata. Die 12458-Verlustmutante sowie die PYL4::12458 und PYL5::12458 waren dagegen vollständig ABA-insensitiv und die Belichtung führte trotz ABA-Behandlung zur Stomaöffnung (Abbildung 3-2 C). Wurden allerdings Blätter der 11458-Verlustmutante (PYL2 nativ exprimiert) oder der PYL2::12458 mit ABA vorinkubiert, blieb, wie beim Wildtyp, die lichtinduzierte Stomaöffnung aus (Abbildung 3-2 A und B). In einem weiteren Versuchsaufbau wurde ABA mit Hilfe von Elektroinfusion gezielt an einzelne Stomata intakter Pflanzen appliziert und deren Stomaschluss mikroskopisch verfolgt (Durchgeführt von J. Herrmann). Damit konnten die Ergebnisse der Gaswechsellmessungen bestätigt und gezeigt werden, dass PYL2 zusammen mit PYR1 hinreichend für den ABA-induzierten Stomaschluss ist, PYL4 und 5 aber nicht (Abbildung 3-2 und Abbildung 3-3).

Auch Änderungen des CO₂-Gehalts der Luft hatten in Microarray-Analysen Auswirkungen auf die Expression einzelner ABA-Rezeptoren in Schließzellen (Tabelle 3-1). Daher wurde in dieser Arbeit auch der CO₂-induzierte Stomaschluss der Rezeptormutanten überprüft, der zumindest anteilig über den ABA-Signalweg in Schließzellen vermittelt zu werden scheint (Chater et al. 2015; Hsu et al. 2018). Der Stomaschluss von fünffach und sechsfach Rezeptor-

Verlustmutanten wurde in früheren Studien bereits als unvollständig beschrieben (Merilo et al. 2013) obwohl eine neuere Studie nur einen geringen CO₂-Phänotyp der 12458-Verlustmutante nachweisen konnten (Hsu et al. 2018). Dementgegen steht aber eine Studie mit Arabidopsis dreifach Verlustmutanten der Rezeptoren PYR1, PYL2 und PYL4 von Chater et al. (2015). Die Autoren konnten bereits eine signifikante Beteiligung mindestens eines dieser drei ABA-Rezeptoren am CO₂-induzierten Stomaschluss nachweisen. In deren Studie wies die 124-Verlustmutante ebenfalls einen CO₂-Phänotyp mit unvollständigem Stomaschluss auf. Auch beide in der vorliegenden Arbeit untersuchten fünffach Verlustmutanten zeigten eine verminderte CO₂-Sensitivität mit unvollständigem Stomaschluss (Abbildung 3-4). Ergänzend zu den Ergebnissen der oben beschriebenen Studie von Chater et al. (2015) konnte hier die Komplementation sowohl des PYL4-, als auch des PYL5- und in geringerem Maße auch des PYR1-Rezeptors die CO₂-Sensitivität der 12458-Verlustmutante wiederherstellen (Abbildung 3-4 A und C). Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass die beiden Rezeptoren PYL4 und PYL5, hinreichend für den CO₂-induzierten Stomaschluss sind. Im Gegensatz dazu spielte PYL2, der entscheidend für die ABA-Reaktion der Stomata war, bei der CO₂-Antwort keine Rolle (Abbildung 3-4 B). Diese Ergebnisse belegen eindrucksvoll, dass die ABA-Rezeptoren der Schließzellen nicht einfach redundant sind, sondern distinkte Aufgaben verrichten können.

4.1.2 ABA-Rezeptoren und Signalspezifität

In der hier durchgeführten Studie konnten durch Gaswechseluntersuchungen der Arabidopsis ABA-Rezeptormutanten erstmals einzelnen ABA-Rezeptoren spezifische Funktionen in Schließzellen beim schnellen Stomaschluss durch verschiedene Signale zugeordnet werden. Allerdings bleibt es unklar, wie die Spezifität dieses Signalnetzwerks bei gleichzeitigem Vorhandensein der verschiedenen Rezeptoren im Detail erzielt und reguliert wird, da alle Rezeptoren ABA binden können (Szostkiewicz et al. 2010; Tischer et al. 2017).

Die Beteiligung der ABA-Rezeptoren selbst am CO₂-induzierten Stomaschluss legt entweder einen (wenn auch möglicherweise minimalen) Anstieg des ABA-Gehaltes oder eine Änderung der Rezeptormenge bzw. Zusammensetzung der Schließzellen durch die Erhöhung des CO₂-Levels nahe. Gegen einen CO₂-abhängigen Anstieg des ABAs in Schließzellen sprechen aber die Ergebnisse früherer Studien, in denen die ABA-Mangelmutanten *Ataba1* und *Ataba3* keinen Phänotyp in der stomatären CO₂-Antwort aufwiesen (Webb und Hetherington 1997; Merilo et al. 2013) sowie neuere Ergebnisse, die keinen Anstieg des ABA-Gehalts in Schließzellen durch hohe CO₂-Konzentrationen nachweisen konnten (Hsu et al. 2018). Dementgegen stehen die Ergebnisse von Chater et al. (2015), die für eine andere Arabidopsis ABA-Mangelmutante (*nced3nced5*) einen deutlichen Phänotyp in der stomatären CO₂-Antwort nachweisen konnten. Eine mögliche Erklärung für diese Unterschiede könnte im basalen ABA-

Gehalt der Mutanten liegen (Chater et al. 2015). Während der ABA-Gehalt der *nced3nced5* Doppelverlustmutanten nur rund 1,5% der Wildtyp-Pflanzen beträgt (Leon-Kloosterziel et al. 1996; Frey et al. 2012) liegt der ABA-Gehalt der *aba1*- und *aba3*-Verlustmutanten noch bei rund 15%, was möglicherweise ausreichend ist, um den Stomaschluss durch CO₂ auszulösen. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte in einer Reihe von Interaktionsstudien zu finden sein, die unterschiedliche Affinitäten der Rezeptoren zu ABA nachweisen konnten (Szostkiewicz et al. 2010; Tischer et al. 2017). Die ABA-Rezeptoren können aufgrund von Sequenzhomologien in drei Untergruppen unterteilt werden, die sich in ihren Eigenschaften unterscheiden. Tatsächlich gehören PYL4 und PYL5, die eine wichtige Rolle in der stomatären CO₂-Antwort zu spielen scheinen, zur selben Gruppe (Untergruppe II), während PYL2 zur Untergruppe III gehört. Die Mitglieder der Gruppe III bilden in Abwesenheit von ABA Homodimere und haben eine deutlich geringe Affinität zu ABA als die Rezeptoren der Untergruppe I und II (Hao et al. 2011). Mitglieder der Gruppe II dagegen liegen zytosolisch als Monomere vor und haben verglichen mit Gruppe III eine hohe ABA-Affinität (Szostkiewicz et al. 2010; Tischer et al. 2017). So könnte ein Anstieg im atmosphärischen CO₂-Gehalt zu geringen Änderungen des ABA-Gehalts von Schließzellen führen, der wiederum nur durch die hochaffinen ABA-Rezeptoren der Schließzelle wie PYL4 und PYL5 perzipiert wird, nicht aber durch niederaffine Rezeptoren wie PYL2.

Allerdings war die stomatäre Antwort aller Rezeptormutanten, die keinen funktionellen PYL2-Rezeptor enthielten, selbst auf hochkonzentriertes (50µM ± ABA), über die Petiole appliziertes ABA, in den hier durchgeführten Gaswechseluntersuchungen unvollständig. Lediglich die Anwesenheit von PYL2 (und in geringerem Maße PYR1) konnte den Stomaschluss nach Anstieg des ABA-Gehalts vermitteln. Interessanterweise führte die Komplementation mit den in dieser Studie untersuchten hochaffinen Rezeptoren wie bspw. PYL4 und PYL5 in der 12458-Verlustmutante (PYL1 vorhanden) nicht zu einer Wiederherstellung der ABA-Sensitivität, und das obwohl das ABA mit einer sehr hohen Konzentration von 50µM ± ABA verabreicht wurde und diese Rezeptoren eine höhere Affinität zu ABA aufweisen als PYL2 (Szostkiewicz et al. 2010). Daher müssen weitere Faktoren an der Modulation der ABA-Antwort von Schließzellen beteiligt sein.

In einer umfangreichen, kombinatorischen Studie haben Tischer et al. (2017) alle 126 möglichen Interaktionen zwischen den neun in Arabidopsis exprimierten PP2Cs und den 14 PYR/PYLS untersucht. Dabei unterschieden sich die Rezeptoren sowohl in ihrer Interaktionsstärke mit verschiedenen PP2Cs, als auch in der ABA-Abhängigkeit der Interaktionen. Darüber hinaus konnte bereits gezeigt werden, dass ABA einen negativen Einfluss auf die Expression vieler PYR/PYLS hat (Santiago et al. 2009; Gonzalez-Guzman et

al. 2012). Die ABA-Abhängigkeit der Rezeptorexpression und der Effekt verschiedener ABA-Konzentrationen auf die Rezeptorexpression wurde daher in der hier durchgeführten Studie in einem Dosis-Wirkungsexperiment an Arabidopsis Schließzellen untersucht (Abbildung 3-5). Die Expression der meisten PYR/PYLs war ABA-abhängig und tatsächlich gab es dabei auch Unterschiede in der ABA-Sensitivität der Expression zwischen den einzelnen Rezeptoren. Während die Transkription von PYL1 völlig ABA-unabhängig war, nahm die Transkriptmenge von PYR1, PYL2, 4, 5 und 8 durch die ABA-Behandlung ab. Mit Ausnahme von PYL4 trat diese Reprimierung der Transkription nur bei hohen ABA-Konzentrationen auf. Die PYL4-Expression war deutlich ABA-sensitiver und reagierte bereits bei einer 100fach niedrigeren ABA-Konzentration (Abbildung 3-5 D). Verglichen mit stark ABA-abhängigen Transkripten, wie dem Transkriptionsfaktor MYB60 oder dem zu den LEA-Proteinen (englisch: *late embryogenesis abundant*) gehörenden ABR, ist die ABA-Sensitivität von PYL4 zehnfach höher. Zusätzlich konnte mittels Microarrays von Arabidopsis Wildtyp-Schließzellen, die mit den Stomaschluss-Stimuli Luftfeuchte, erhöhtem atmosphärischem CO₂, Dunkelheit und ABA behandelt wurden, gezeigt werden, dass alle vier Stimuli die Expression eines distinkten Sets an ABA-Rezeptoren beeinflussen (Tabelle 3-1). Auch für Raps (*Brassica napus*) konnte mittlerweile gezeigt werden, dass die Expression verschiedener PYR/PYLs durch Trockenheit, Hitze und Salzstress reguliert wird, und dass sich die Sensitivität der Expression einzelner Rezeptoren gegenüber den verschiedenen Stimuli unterscheidet (Di et al. 2018). Darüber hinaus ist auch der Abbau einiger der PYR/PYLs durch das 26s Proteasom ABA-abhängig (Irigoyen et al. 2014; Bueso et al. 2014). Für PYL8, der eine spezifische Rolle bei der Regulation des Wurzelwachstums spielt (Zhao et al. 2014), konnte bspw. gezeigt werden, dass ein Anstieg des ABA-Gehalts den Abbau des AtPYL8-Proteins im Kern hemmt (Irigoyen et al. 2014) und auch für PYR1 und PYL4 wurde ein Abbau über das 26s Proteasom nachgewiesen (Bueso et al. 2014). Der Abbau der PP2C-Phosphatase AtABI1 scheint ebenfalls von der Gegenwart der ABA-Rezeptoren abzuhängen (Kong et al. 2015). Diese strenge und für die einzelnen Rezeptoren individuelle Regulation der Rezeptormenge, sowohl auf transkriptioneller als auch auf Proteinebene, scheint demnach ein wesentlicher Bestandteil der Modulation des ABA-Signalwegs als Reaktion auf verschiedene Stimuli zu sein. Dies, zusammen mit den Ergebnissen der hier vorgelegten Studie, deutet an, dass bereits geringe Änderungen des zellulären ABA-Gehalts in Schließzellen durch externe Stimuli ausreichen, um Änderungen der Rezeptorkomposition und damit der Sensitivität von Schließzellen gegenüber ihrem internen ABA zu bewirken. So könnte letztlich der ABA-Signalweg spezifisch für verschiedene Stimuli moduliert werden.

4.1.3 Transkriptionelle Regulation durch ABA-Rezeptoren

Ein Absinken der Luftfeuchte, ein Anstieg im atmosphärischen CO₂, Dunkelheit und ABA sind Stimuli, die schlussendlich alle über die Aktivierung von Ionenkanälen zum Stomaschluss führen. Während der schnelle Signalweg der einzelnen Stimuli, der letztlich innerhalb weniger Minuten zum Stomaschluss führt, viele Überschneidungen aufweist (siehe 1.3), lösen die Stimuli aber auch längerfristige und individuelle Anpassungen, vor allem auf transkriptioneller Ebene aus (Bauer et al. 2013). Ob die einzelnen PYR/PYLs, ähnlich wie beim schnellen Stomaschluss, auch bei der langsamen, transkriptionellen Schließzell-Antwort spezifische Funktionen haben und einzelne Rezeptoren die Expression bestimmter Gene kontrollieren, wurde am Beispiel von ABA an den Arabidopsis Rezeptormutanten geprüft (siehe 3.1.3).

Bereits 2012 konnten Gonzalez-Guzman et al. für verschiedene Arabidopsis fünffach und sechsfach ABA-Rezeptormutanten zeigen, dass ABA nur noch zu einer sehr geringen Induktion typischer ABA-regulierter Gene wie RAB18 oder KIN2 im Blattgewebe führte. Demnach müssen die ABA-Rezeptoren selbst an der Expressionsregulation von nachgeschalteten (englisch: *downstream*) Genen beteiligt sein. Es gab bereits Hinweise darauf, dass z.B. PYL1 bei der ABA-Induktion von RAB18 und RD29B beteiligt zu sein scheint, da ABA in 1458-Verlustmutanten und 12458-Verlustmutanten, die beide ein funktionales PYL1 Gen exprimierten, zu einer deutlich stärkeren Induktion dieser Gene führte als in der 1124-Verlustmutante, die keinen funktionellen PYL1-Rezeptor exprimierte (Gonzalez-Guzman et al. 2012). Auch in der vorliegenden Arbeit war die ABA-Induktion solcher Transkripte in beiden fünffach Rezeptormutanten gestört (siehe 3.1.3), und die Expressionsmuster der untersuchten Gene, deuteten an, dass die ABA-Rezeptoren auch bei der Regulation der Genexpression nicht redundant sind sondern einzelne Rezeptoren distinkte Sets an Genen ansteuern. So fanden sich zwischen den verschiedenen Komplementationsmutanten deutliche Unterschiede. Die Induktion von ABI1, ABI2 sowie der Kalzium-abhängigen Kinase CIPK25 in der 12458-Verlustmutante (PYL1 vorhanden) durch ABA war mit der Induktion in Wildtyp-Pflanzen vergleichbar, während in der 11458-Verlustmutante (PYL2 vorhanden) keine Induktion nachgewiesen werden konnte (Abbildung 3-7), was auf eine wichtige Rolle von PYL1 an der Regulation der Transkription dieser Gene hindeutet. Die Komplementation von 11458-Verlustmutanten mit PYL1 reichte außerdem aus, um die ABA-Sensitivität der Transkription von ABI1 und ABI2 wiederherzustellen. Neben PYL1 führte aber auch die Komplementation der 11458-Verlustmutante mit PYR1 zu einer Wildtyp-ähnlichen Induzierbarkeit von ABI1 und ABI2 während PYL4 und PYL5 keinen Einfluss auf die ABA-Induzierbarkeit hatten (siehe 3.1.3).

Umgekehrt wurde die Expression des schließzellspezifischen Transkriptionsfaktors MYB60, der negativ durch ABA reguliert wird (Cominelli et al. 2005), nur in 11458- (PYL2 vorhanden), nicht aber in 12458-Verlustmutanten (PYL1 vorhanden) durch ABA reprimiert (Abbildung 3-7) und die Komplementation der 12458-Verlustmutante mit PYR1 und vor allem mit PYL2 stellte die ABA-Sensitivität der MYB60 Expression wieder her. AtMYB60 selbst ist an der lichtinduzierten Stomaöffnung von Arabidopsis beteiligt (Cominelli et al. 2005) und *Atmyb60*-Verlustmutanten wiesen nur noch eine sehr verminderte, lichtinduzierte Stomaöffnung auf (Cominelli et al. 2005). Interessanterweise konnte in den hier durchgeführten Untersuchungen, gezeigt werden, dass ABA nur in Mutanten mit einem funktionellen PYL2-Rezeptor und damit einer funktionellen ABA-regulierten MYB60-Expression zu einer Inhibierung der lichtinduzierten Stomaöffnung führt (Abbildung 3-2).

Zusammenfassend konnten in dieser Arbeit also einzelnen ABA-Rezeptoren spezifische Funktionen in Arabidopsis zugeordnet werden, was gegen die zunächst vermutete vollständige Redundanz der sechs hauptsächlich in Schließzellen exprimierten PYR/PYLs spricht, die demnach als redundantes „Sicherheitssystem“ den überlebenswichtigen ABA-induzierten Stomaschluss bei Trockenstress garantieren sollen (Park et al. 2009; Gonzalez-Guzman et al. 2012). Die hier vorgelegten Ergebnisse konnten darüber hinaus belegen, dass die Rezeptoren nicht nur am ABA-Signalweg in Stomata beteiligt sind, sondern auch am Stomaschluss der durch andere Signale ausgelöst wird (Abbildung 3-4 und Tabelle 3-1). Dabei unterscheiden sich die Rezeptoren sowohl in ihrer Funktion beim schnellen ABA-Signalweg, der zum Stomaschluss führt, als auch in ihren regulatorischen Eigenschaften bei der Transkription nachgeschalteter Gene und damit der Adaption von Schließzellen an verschiedene externe Bedingungen. Eine individuelle Regulierung der jeweiligen Rezeptormenge durch Änderungen des ABA-Gehalts und andere, noch nicht vollständig bekannte externe und interne Stimuli können die Zusammensetzung des Rezeptorpool von Schließzellen und damit deren ABA-Sensitivität beeinflussen. Somit könnte das ABA-Signal über die Rezeptoren spezifisch für jeden Stimulus zentral zur individuellen Anpassung der Stomaweite an die verschiedensten Änderungen im Umfeld der Pflanze beitragen.

4.1.4 Ausblick PYR/PYL-Rezeptoren

Die Verfügbarkeit von Verlustmutanten der ABA-Rezeptoren sowie der schließzellspezifischen Komplementationslinien erlaubten die Untersuchung der Funktion einzelner Rezeptoren in Arabidopsis-Schließzellen sowohl auf transkriptioneller Ebene, als auch im Stomaschluss-Signalweg. Der Fokus lag dabei auf dem ABA- sowie CO₂-induzierten Stomaschluss. Weitere Messungen sind erforderlich, um auch Aussagen über die Funktion einzelner Rezeptoren beim Stomaschluss durch andere Stimuli wie Luftfeuchte, Ozon oder Dunkelheit treffen zu können.

Außerdem kann durch qPCR-Messungen immer nur die Transkription einzelner, ausgewählter Gene verfolgt werden. Um Aussagen über das gesamte Netzwerk PYR/PYL-gesteuerter Zielgene in Schließzellen treffen zu können, sind Analysen des Schließzell-Transkriptom der verschiedenen Rezeptormutanten durch mRNA-Sequenzierungen oder Microarray Experimente notwendig. Schlussendlich könnten die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse zusammen mit weiteren Untersuchungen helfen, bislang unbekannte Feinheiten des ABA-Signalwegs in Schließzellen aufzudecken. Dieses Wissen könnte dann zur Optimierung wichtiger Nutzpflanzen eingesetzt werden um beispielsweise durch die Applikation von ABA-Agonisten, die spezifische Rezeptoren binden, gezielt einzelne Signalkaskaden zu aktivieren.

4.2 Stomata von Dattelpalmen sind an extreme Standorte angepasst

Während die Stoma-Physiologie von Arabidopsis bereits gut untersucht ist und viele Aspekte der Schließzellantwort auf unterschiedliche externe Stimuli bereits verstanden sind, gibt es nur wenige Daten über die Stoma-Physiologie von Pflanzen, die an extreme Standorte angepasst sind. In der hier durchgeführten Studie wurden daher die Reaktion der Spaltöffnungen von Dattelpalmen auf hohe Lichtintensitäten und ABA untersucht werden.

4.2.1 Die Stomata von Dattelpalmen öffnen erst bei hohen Lichtintensitäten

Bereits in der Lichtreaktion der Stomata waren deutliche Unterschiede zwischen Arabidopsis und Dattelpalmen zu erkennen. Verglichen mit dem Verhalten des Spaltöffnungsapparates von Arabidopsis öffneten die Stomata der Fiederblätter von Dattelpalmen erst bei relativ hohen Lichtintensitäten (Abbildung 3-8 A). Bei geringen Lichtintensitäten bis $350\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ konnte für die Blätter der Palmen kein Anstieg der Transpiration nachgewiesen werden, wohingegen die Transpiration von Arabidopsis bereits bei diesen geringen Lichtintensitäten um ca. 50% zunahm. Außerdem erreichte die Transpirationsrate von Arabidopsis bei sehr hohen Lichtintensitäten (ca. ab $1000\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) eine Sättigung, während die der Palmen-Fiederblätter weiter zunahm und selbst bei der höchsten applizierten Lichtintensität keine Sättigung, und damit keine vollständige Öffnung der Stomata erreichte. Dieses Verhalten könnte eine Anpassung an die noch höheren Lichtintensitäten und die Trockenheit des natürlichen Lebensraums von Dattelpalmen darstellen (Shabani et al. 2012). Das Öffnen der Stomata bei hohen Lichtintensitäten dient der Aufnahme von CO_2 für die Photosynthese und geht immer auch mit einem Verlust von Wasser einher (Lambers et al. 2008). Eine Studie von Arab et al. (2016) mit an Hitze und Trockenheit akklimatisierten Dattelpalmen zeigte, dass auch die netto Photosyntheserate von Dattelpalmen erst bei hohen Lichtintensitäten von über $900\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ eine Sättigung erreichte. Dattelpalmen, die natürlicherweise an sehr hellen Standorten vorkommen, scheinen also auch sehr hohe Lichtintensitäten unter wasserlimitierenden Bedingungen nutzen zu können, indem über minimal geöffnete Stomata

ausreichend CO₂ aufgenommen werden kann. Um möglichst wenig Wasser über Transpiration zu verlieren, öffnen Dattelpalmen die Stomata dafür aber erst bei hohen Lichtintensitäten, die eine hohe Photosyntheserate und Effizienz erlauben.

Bei sensitiven Arten können hohe Lichtintensitäten vor allem unter heißen, wasserlimitierenden Bedingungen, bei denen die Spaltöffnungen nur minimal bis gar nicht geöffnet werden, zu so genanntem photooxidativem Stress führen (Rennenberg et al. 2006; Munné-Bosch et al. 2013). In diesem Fall übersteigt die über die Photosysteme aufgenommene Lichtenergie den Bedarf an Reduktionsäquivalenten des Calvin-Zyklus, und es kommt zur Bildung reaktiver Sauerstoff Spezies (ROS). Tatsächlich wurden Dattelpalmen bereits 1959 in ihrem natürlichen Habitat in Mauretanien als so genannte „Übertemperierer“ charakterisiert, also als Pflanzen, deren Blatttemperatur tagsüber, bei Sonneneinstrahlung durch eine geringe Transpirationsrate (und dadurch wenig Verdunstungskälte) über der Lufttemperatur liegt (Lange 1959). In einer neueren Untersuchung konnte außerdem kein Effekt von Hitze und Trockenheit auf die stomatäre Leitfähigkeit nachgewiesen werden, obwohl die netto Photosyntheserate von Dattelpalmen bei hohen Temperaturen (35°C) im Vergleich zu gemäßigten Temperaturen (20°C) sogar erhöht war (Arab et al. 2016). Darüber hinaus konnte trotz der geringen Transpirationsrate und damit eher geringen CO₂-Aufnahmerate kein Anstieg von ROS im Blattgewebe der Dattelpalmen nachgewiesen werden, was auf ein effizientes ROS-Entgiftungssystem schließen lässt (Arab et al. 2016).

Zusammengenommen deuten die Ergebnisse der hier durchgeführten Untersuchungen und die wenigen publizierten Daten über das Verhalten der Spaltöffnungen der Dattelpalmen, auf eine Anpassung der Stoma-Physiologie zu Gunsten des Wasserhaushalts hin (Arab et al. 2016; Müller et al. 2017). So scheinen Dattelpalmen selbst bei hohen Lichtintensitäten und heißen Temperaturen die Stomata geschlossen halten zu können, um so den Wasserverlust durch Transpiration minimal zu halten (Müller et al. 2017) und trotzdem eine optimale Photosyntheseleistung erzielen zu können (Arab et al. 2016).

4.2.2 Der ABA-induzierte Stomaschluss von Dattelpalmen benötigt Nitrat

Der ABA-induzierte Stomaschluss in Angiospermen wird als eine der wichtigsten Anpassungen höherer Landpflanzen an Wassermangel angesehen (Lind et al. 2015; Sussmilch et al. 2017). Deshalb wurde auch der ABA-induzierte Stomaschluss von Dattelpalmen vergleichend mit dem der Modellpflanze Arabidopsis in dieser Arbeit untersucht. Über die Petiole verabreichtes ABA bewirkte bei Arabidopsis Wildtyp-Pflanzen bereits nach ca. fünf Minuten den Beginn des Stomaschlusses, der innerhalb von 15 Minuten vollständig abgeschlossen war (Abbildung 3-8 B). Obwohl Dattelpalmen an extremen Trockenstress angepasste Pflanzen sind (Shabani et al. 2012), war deren ABA-Antwort erstaunlicherweise

sehr viel langsamer und schwächer. Der ABA-induzierte Stomaschluss der Dattelpalmen begann erst nach 15 Minuten, und damit 10 Minuten später als in Arabidopsis und blieb auch nach rund einer Stunde unvollständig (Abbildung 3-8 B). Dass die Ursache hierfür nur eine langsamere Transportgeschwindigkeit des ABAs im Leitgewebe der Fiederblätter von Dattelpalmen war, konnte allerdings ausgeschlossen werden. In einem Kontrollexperiment wurde die Transportgeschwindigkeit von DCMU mittels Chlorophyllfluoreszenz-Messungen bestimmt (Abbildung 3-9). DCMU inhibiert den Elektronentransport des PSII und führt so zu einer messbaren Änderung der Chlorophyllfluoreszenz (Maxwell und Johnson 2000). Die so ermittelte Transportgeschwindigkeit war in den Fiederblättern der Dattelpalme sogar geringfügig höher als im Leitgewebe von Arabidopsis Blättern, was auf eine vergleichbare Transportgeschwindigkeit von ABA im Leitgewebe beider Arten hindeutete und der verzögerte ABA-induzierte Stomaschluss der Dattelpalme demnach andere Gründe haben musste.

Beim Stomaschluss spielen Anionenkanäle der SLAC/SLAH-Familie, die in der Plasmamembran von Schließzellen lokalisiert sind, eine zentrale Rolle (Negi et al. 2008; Vahisalu et al. 2008; Geiger et al. 2011). Wird AtSLAC1 in Arabidopsis über den ABA-Signalweg aktiviert, werden Anionen, wie Cl^- und NO_3^- entlassen (Geiger et al. 2009). Auch das in Schließzellen exprimierte SLAC1-Homolog AtSLAH3, kann über den ABA-Signalweg aktiviert werden, benötigt aber, im Gegensatz zu AtSLAC1, zur Aktivierung die Gegenwart von NO_3^- (Geiger et al. 2011). Um mittels Infrarot-Gasanalyse Änderungen der Transpiration durch ABA untersuchen zu können, wird das ABA üblicherweise über die Petiole abgeschnittener Blätter verabreicht, die für die Dauer der Messung mit vollentsalztem Wasser versorgt wurden (siehe 2.3.4). Dieser Versuchsaufbau führte möglicherweise zu einer Abnahme der Chlorid- bzw. Nitratkonzentration im Gewebe. In weiteren Transpirationmessungen sollte daher der Einfluss der Anionen NO_3^- und Cl^- , den Substraten von SLAC/SLAH-Anionenkanälen, auf den ABA-induzierten Stomaschluss von Dattelpalmen untersucht werden (Abbildung 3-10). Die gleichzeitige Zugabe von ABA zusammen mit KCl führte bei Dattelpalmen nicht zu einer Veränderung der Schließzell-Antwort auf ABA. Wurde ABA allerdings zusammen mit KNO_3 verabreicht, wurde der Stomaschluss der Datteln deutlich beschleunigt und entsprach dem von Arabidopsis (Abbildung 3-10 A). Dass der ABA-induzierte Stomaschluss der Fiederblätter von Dattelpalmen durch NO_3^- , nicht aber durch Cl^- deutlich verbessert werden konnte, zeigte, dass der ABA-induzierte Stomaschluss von Dattelpalmen im Gegensatz zum Stomaschluss von Arabidopsis (Abbildung 3-10 B und D), nitratabhängig ist.

4.2.2.1 Nutzen Dattelpalmen bei Stomabewegungen hauptsächlich Nitrat als Anion anstelle von Chlorid?

Im Zusammenhang mit den Transpirationmessungen wurde auch der Chloridgehalt von Schließzellen offener und geschlossener Stomata bestimmt und es konnte gezeigt werden, dass der Chloridgehalt während des Stomaschlusses deutlich abnimmt (Müller et al. 2017). Zusätzlich konnten die elektrophysiologischen Eigenschaften des AtSLAC1-Homologes aus Dattelpalmen, PdSLAC1 im heterologen Expressionssystem von *Xenopus* Eizellen charakterisiert werden (Müller et al. 2017). Verglichen mit AtSLAC1, wies PdSLAC1 dabei eine hohe Leitfähigkeit für Nitrat auf. Darüber hinaus konnte neben der Aktivierung durch die Kinase OST1, auch eine nitratabhängige Chlorid-Leitfähigkeit von PdSLAC1 gezeigt werden (Müller et al. 2017). Diese dem AtSLAH3 ähnlichen Eigenschaften von PdSLAC1 konnten mittlerweile auch für das SLAC-Homolog aus der ebenfalls monokotylen Gerste (HvSLAC1) bestätigt werden (Schäfer et al. 2018). In dieser Studie identifizierten Schäfer et al. (2018) außerdem ein Aminosäurepaar in der Transmembrandomäne 3 des SLAC-Proteins, das für die nitrataktivierte Chlorid-Leitfähigkeit des HvSLACs verantwortlich ist. In Aminosäure-Sequenzvergleichen verschiedener SLAC1-Homologe monokotyle und dikotyle Pflanzenarten zeigte sich, dass SLAC1-Homologe aus Dikotylen an dieser Position (in AtSLAC1 Position 272 and 273) zwei Valin (V) oder je ein Isoleucin (I) und ein Valin aufweisen, wohingegen in den monokotylen SLAC1-Homologen, einschließlich des PdSLAC1, an der entsprechenden Position ein Isoleucin und Alanin (A) zu finden ist (Schäfer et al. 2018). Die Mutation des AtSLAC1 VV-Motivs in das PdSLAC1 IA-Motiv führten zu einer nitratabhängigen Aktivierung von AtSLAC1. Der Austausch des IA-Motivs von PdSLAC1 bzw. HvSLAC1 in VV resultierte aber nicht in einer nitratunabhängigen Chloridleitfähigkeit (wie bei AtSLAC1). Die Nitrataktivierbarkeit muss demnach durch zusätzliche strukturelle Eigenschaften der monokotylen SLAC1-Homologe vermittelt werden (Schäfer et al. 2018). Andere Studien fanden für die SLAC1-Homologe der beiden monokotylen Reis und Mais (OsSLAC1 und ZmSLAC1) eine strikte Nitratselektivität, aber keine Nitrataktivierbarkeit oder nitratabhängige Chloridleitfähigkeit (Sun et al. 2016; Qi et al. 2018), obwohl die Proteinsequenzen dieser SLACs ebenfalls das für Monokotyle typische IA-Motiv enthalten (Schäfer et al. 2018). Auch wenn die strukturellen Grundlagen der Nitrataktivierbarkeit vieler Monokotyle SLACs noch nicht vollständig bekannt sind, so ist der evolutionäre Ursprung der Entstehung dieser Eigenschaft, der Spaltung von monokotylen und dikotylen Pflanzen (Schäfer et al. 2018), doch bemerkenswert und war möglicherweise grundlegend für deren evolutionäre Aufspaltung. Der evolutionäre Erfolg monokotyle Arten besonders an extremen Standorten wird unter anderem der schnelleren Anpassungsfähigkeit der Stomata an variierende Bedingungen zugeschrieben (Brownlee 2018). Ob aber auch die Aktivierbarkeit des PdSLAC1 durch erhöhte apoplastische

Nitratkonzentrationen eine zusätzliche Anpassung an extreme Standorte darstellt, die möglicherweise die Reaktionsgeschwindigkeit der Stomata beeinflusst, kann an dieser Stelle nicht abschließend geklärt werden und bleibt Gegenstand der Forschung.

4.2.3 Morphologische Anpassungen der Stomata von *Phoenix dactylifera*

Auch morphologisch unterscheiden sich die Stomata monokotyler Pflanzen von denen dikotyler Pflanzen wie *Arabidopsis* (Müller et al. 2017). Die Schließzellen von Vertretern der erst spät innerhalb der Monokotylen entstanden echten Gräser (*Poales*) wie Gerste, Weizen oder Mais sind von zwei Nebenzellen umgeben (Chen et al. 2017). Die enge Verbindung der Schließzellen mit den Nebenzellen gilt unter anderem als Ursache für die allgemein höhere Reaktionsgeschwindigkeit der Grass-Stomata auf externe Stimuli (Franks und Farquhar 2007; Kollist et al. 2014). Bereits 1971 zeigten Raschke und Fellows, dass bei Stomabewegungen von *Zea mays* eine Verschiebung von Kalium-Ionen zwischen Schließ- und Nebenzellen stattfindet, und auch für Gerste ist dieser Shuttle-Transport mittlerweile nachgewiesen (Schäfer et al. 2018). Durch den Austausch von osmotisch wirksamen Teilchen zwischen Nebenzellen und Schließzellen nimmt der Turgor der Nebenzellen bei der Stomaöffnung drastisch ab, was deren Volumen stark verkleinert, während der Turgor der Schließzellen bei der Öffnung zunimmt (Franks und Farquhar 2007). Die daraus resultierende große Öffnungsweite der Grass-Spaltöffnungen führt zu einer Erhöhung der stomatären Leitfähigkeit und einer gesteigerten Wassernutzungseffizienz (Franks und Farquhar 2007). Auch die Stomata der evolutionär früh entstandenen monokotylen Dattelpalmen haben Nebenzellen, allerdings ist hier jedes Schließzellpaar, anders als bei Gräsern, von vier Nebenzellen umgeben (Müller et al. 2017). Es ist davon auszugehen, dass auch Dattelpalmen solch einen Shuttle-Mechanismus nutzen, um schnell auf äußere Stimuli reagieren zu können. Im Zusammenhang mit der hier durchgeführten Doktorarbeit konnte den vier Nebenzellen der Stomata von Dattelpalmen eine weitere Funktion zugeordnet werden. In elektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigte sich, dass die Pore der Stomata von Dattelpalmen von einer massiven, in den Nebenzellen gebildeten Wachsschicht umgeben wird (Müller et al. 2017). Diese sogenannten „stomatären Schornsteine“ (Barthlott et al. 1998) erhöhen den stomatären Widerstand und gelten ebenfalls als eine Anpassung an trockene Standorte, um Wasserverlust zu vermeiden.

Zusammengefasst weist die Stoma-Physiologie, der an Trockenheit und Hitze angepassten Dattelpalme sowohl physiologische, als auch morphologische Besonderheiten auf, die eine effiziente Regulierung des stomatären Gasaustauschs ermöglichen umso den Wasserverlust gering zu halten.

4.2.4 Ausblick

Die Regulation der Stomaweite der toleranten Dattelpalmen unterscheidet sich grundlegend von der von Arabidopsis. Besonders die Nitrataktivierbarkeit von PdSLAC1, die scheinbar auf strukturellen Unterschieden von SLAC-Homologen monokotyle Pflanzen zu denen dikotyle Pflanzen beruht (Schäfer et al. 2018), wirft aber auch weitere Fragen auf. Im Allgemeinen entscheidet der Nitrat-Status von Pflanzen unter anderem auch über die Synthese-Rate von pflanzlichen Hormonen und somit auch anteilig über die Synthese von ABA (O'Brien et al. 2016). Dass der ABA induzierte Stomaschluss von Dattelpalmen extrazelluläres Nitrat benötigt, legt darüber hinaus eine Rückkopplung des Stickstoffhaushalts auf den Wasserhaushalt und andersherum nahe. Genauere Einblicke in das Zusammenspiel dieser beiden Faktoren könnten Untersuchungen der Stoma-Physiologie in Abhängigkeit von der Stickstoff- bzw. Nitratverfügbarkeit und der Wasserverfügbarkeiten gewonnen werden. Ein Verständnis solcher Rückkopplungsmechanismen kann dann auf andere wirtschaftlich bedeutsame monokotyle Nutzpflanzen wie Weizen, Gerste oder Reis übertragen werden, um deren Wasserbilanz zu optimieren und so helfen, auch in Zukunft ausreichend Ertrag zu erzielen.

4.3 Die Salztoleranz von Dattelpalmen

Eine effiziente Regulation der Stomaöffnungsweite minimiert den Wasserverlust durch Transpiration bei Trockenheit, was für Pflanzen auch bei kurzfristigem Salzstress von Vorteil sein kann. Ähnlich wie Trockenheit führt auch eine hohe Konzentration von Natrium- und Chlorid-Ionen im Boden zu einem Absinken des Wasserpotentials der Bodenlösung, wodurch die Wasseraufnahme über die Wurzeln für Pflanzen erschwert wird (Munns 2002). So ist es wenig überraschend, dass Dattelpalmen, neben heißen und trockenen Standorten, auch Habitate mit salzigen Böden besiedeln können (Zaid und de Wet 2002). Langfristiger Salzstress bedeutet für Pflanzen, neben osmotischem Stress (Wassermangel), aber auch Ionenstress durch die Aufnahme von überschüssigem Chlorid und Natrium in die Zellen (Munns und Tester 2008). In den hier durchgeführten Untersuchungen wurden Dattelpalmen des als salztolerant geltenden Kultivars *Khalas* für sechs Wochen mit 600mM NaCl haltigem Wasser bewässert (siehe 2.1.3). Dabei wiesen die Pflanzen eine beeindruckende Toleranz gegenüber dem Salzstress auf und äußerlich waren keine negativen Auswirkungen der Salzbehandlung auf die Dattelpalmen erkennbar.

4.3.1 Natriumausschluss als Schlüssel zur Salztoleranz in Dattelpalmen?

Die Bestimmung des Natriumgehalts einzelner Fiederblätter von Dattelpalmen, die mit 600mM NaCl bewässert wurden zeigte eindeutig, dass die Dattelpalmen bei Salzstress kein toxisches Natrium in die oberirdischen Pflanzenteile aufnahmen (siehe 3.3.2), was im Gegensatz zu den Ergebnissen von Al Kharusi et al. (2017) steht. In deren Studie wurde die Akkumulation von Natrium im Blattgewebe des Kultivars *Khalas* durch Salzstress festgestellt, wodurch auf eine niedrige Salztoleranz dieses Kultivars geschlossen wurde. Im Allgemeinen gilt *Khalas* aber als überdurchschnittlich salztolerant (Alhammadi und Edward 2009; Bhat et al. 2013), was Alhammadi und Edward (2009) unter anderem auf die geringe Aufnahme von Na⁺ in das Blattgewebe unter Salzstress zurückführten. Ein Ausschluss dieser toxischen Ionen aus photosynthetisch aktivem Gewebe wird als eines der Schlüsselmerkmale salztoleranter Pflanzen diskutiert (Munns und Tester 2008). So konnte beispielsweise die gesteigerte Salztoleranz wilder Gerste-Varietäten mit einem besseren Ausschlussvermögen von Na⁺ aus dem Blattgewebe korreliert werden (Garthwaite et al. 2005) und auch für Mais konnte solch ein Zusammenhang nachgewiesen werden (Zhang et al. 2018). Um genauere Einblicke in die Mechanismen zu erhalten, mit denen die hier untersuchten Dattelpalmen eine Akkumulation des Natriums im Blattgewebe verhindern, wurde die Salzaufnahme über die Wurzeln genauer untersucht. Die Wurzeln von Dattelpalmen verfügen im Gegensatz zu Arabidopsis oder Tabak über keine Wurzelhaarzone (Dreyer et al. 2010), über die in anderen Pflanzen aber ein Großteil der Nährstoffaufnahme stattfindet (Gilroy und Jones 2000). Deshalb wurden ganze Wurzeln in verschiedene Abschnitte unterteilt, um so einen genaueren Einblick in die Akkumulation von Natrium innerhalb des Wurzelgewebes zu erhalten (siehe 2.2.2). Die Salzbehandlung führte zu einer deutlichen Zunahme des Natriumgehalts in Wurzeln und interessanterweise gab es dabei tatsächlich Unterschiede zwischen verschiedenen Wurzelregionen. Während der Natriumgehalt in salzbehandelten Pflanzen in Bereichen nahe der Wurzelspitze deutlich zunahm, konnte in oberen, dem Wurzelursprung nahen Abschnitten, nur eine geringe Zunahme festgestellt werden (Abbildung 3-11).

Demnach scheinen Dattelpalmen Natrium entweder nur sehr langsam und hauptsächlich an der Wurzelspitze aufzunehmen, oder über einen effizienten Mechanismus zu verfügen, dass aufgenommene Natrium aus bestimmten Bereichen und vor allem den oberirdischen Teilen auszuschließen. Die molekularen Details dieses Ausschlusses von Natrium aus Pflanzen sind aber noch nicht vollständig entschlüsselt. Viele Studien deuten auf die Rolle von HKT1-Orthologen beim Rücktransport von Na⁺ aus dem Xylem hin (Davenport et al. 2007; Munns et al. 2012; Zhang et al. 2018), allerdings ist diese Funktion aufgrund von niedrigeren Na⁺-Konzentration im Spross von HKT1-Verlustmutanten (Rus et al. 2001; Han et al. 2018)

umstritten. Andere Studien betonen vor allem die Funktion des SOS-Transportsystems am Efflux von Na^+ aus Zellen bei Salzstress. Basierend auf der Lokalisation von AtSOS1 in Epidermiszellen an der Wurzelspitze und in Xylem-Perizykelzellen wird die Funktion beim Rücktransport von Natrium aus dem Xylem und dem Transport von Na^+ aus Wurzelepidermiszellen zurück in den Boden diskutiert (Shi et al. 2000; Shi et al. 2002; Shi et al. 2003). In Arabidopsis wird die Expression des Plasmamembran lokalisierten Na^+/H^+ -Antiporters AtSOS1 durch Salzstress induziert und im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Salzstress auch in Wurzeln von Dattelpalmen zur Induktion von PdSOS1 führt (Abbildung 3-12). Besonders auffällig war dabei die direkte Korrelation des erhöhten Salzgehalts in den unteren, der Wurzelspitze nahen Abschnitten mit der Induktion von PdSOS1. Eine Studie über die Funktion von SOS1 bei der Salztoleranz der halophytischen *T. salsuginea* lieferte ähnliche Ergebnisse. So konnte in einem direkten Vergleich mit der nahe verwandten Arabidopsis gezeigt werden, dass die höhere Salztoleranz von *T. salsuginea* zumindest teilweise aus einer deutlich höheren Expressionsrate von ThSOS1 resultierte (Oh et al. 2009). Darüber hinaus deutete die höhere Natrium-Akkumulation in der Wurzelspitze und in der direkt darüber liegenden Streckungszone in *thsos1*-Mutanten im Vergleich zu Wildtyp Pflanzen darauf hin, dass ThSOS1 vor allem am Export von Na^+ aus diesen Bereichen beteiligt zu sein scheint. Auch die starke Induktion von PdSOS1 vor allem in der Wurzelspitze und der Streckungszone deuten darauf hin, dass in Dattelpalmen ähnlich wie in *Thellungiella*, PdSOS1 hauptsächlich an der Na^+ -Homöostase dieser Wurzelbereiche beteiligt ist.

Eine der wichtigsten negativen Auswirkungen von NaCl-Stress ist die Abnahme der Kaliumkonzentration und die daraus resultierende drastische Verschiebung des K^+/Na^+ -Verhältnisses im Zytosol pflanzlicher Zellen. Die Fähigkeit, die Kaliumkonzentration auch unter Salzstressbedingungen konstant zu halten, gilt deshalb als Schlüsselmerkmal toleranter Arten (Munns und Tester 2008). Auch in der hier durchgeführten Studie konnte kein negativer Effekt von Salzstress auf den Kaliumgehalt der Dattelpalmen, weder in Fiederblättern noch in Wurzeln, nachgewiesen werden (Abbildung 3-11 B und D). Eine andere Studie zeigte sogar eine Zunahme des Kaliumgehalts in Fiederblättern von verschiedenen Dattelpalmen Kultivaren durch Salzstress, unter anderem auch für das hier verwendete Kultivar *Khalas* (Al Kharusi et al. 2017). Um Transportproteine zu identifizieren, die die Kaliumaufnahme in Wurzeln der Dattelpalme selbst unter Salzstressbedingungen vermitteln könnten, wurde die Expression zweier putativer Kalium-Transportproteine, PdHAK5 und PdKT1, genauer untersucht. PdHAK5 wurde in Kontrollpflanzen überwiegend in den oberen Wurzelabschnitten exprimiert und Salzstress hatte einen negativen Effekt auf die PdHAK5 Expression (Abbildung 3-12). Interessanterweise werden speziell die Unterschiede in der Regulation von HAK5-Orthologen als mitverantwortlich an der gesteigerten Salztoleranz einiger Arten diskutiert.

Allerdings konnte die Reprimierung der HAK5-Expression bislang hauptsächlich bei salzsensitiven Arten nachgewiesen werden. So führte Salzstress in Arabidopsis ebenfalls zu einer Reprimierung der AtHAK5 Expression (Nieves-Cordones et al. 2010) und Vergleiche mit *Thellungiella* deuteten an, dass die HAK5-Expression in *Thellungiella* deutlich weniger salzsensitiv ist (Aleman et al. 2009a). Untersuchungen des halophytischen Eiskrauts (*M. crystallinum*) deuten sogar auf eine Induktion von HAK5 durch Salzstress hin (Su et al. 2002). An anderen Arten konnte bereits gezeigt werden, dass die Expression verschiedener HAK/KUP/KTs unterschiedlich durch Salzstress beeinflusst wird (Azeem et al. 2018; Li et al. 2018). Kürzlich konnte auch in Wurzeln von Dattelpalmen die differentielle Regulierung verschiedener HAK/KUP/KTs durch kurzfristigen Salzstress nachgewiesen werden (Yaish et al. 2017). Auch in den hier durchgeführten Untersuchungen konnte die Expression von PdKT1, einem anderen putativ hochaffinen Kaliumtransporter der HAK/KUP/KT-Familie im Wurzelgewebe der Dattelpalmen nachgewiesen werden, der im Gegensatz zu PdHAK5, in allen untersuchten Wurzelabschnitten gleichmäßig exprimiert, aber nicht durch Salz reguliert wurde (Abbildung 3-12). Diese Unterschiede in der Sensitivität der PdKT1- und PdHAK5-Expression gegenüber Salzstressbedingungen könnten auf funktionelle Unterschiede in der Kaliumaufnahme hindeuten (Yaish et al. 2017). Um die Funktion beider Transportproteine *in planta* aber abschließend zu klären, bedarf es weiterer Untersuchungen wie der Charakterisierung der Transporteigenschaften.

Die Salztoleranz von Dattelpalmen scheint also zumindest teilweise in einem effizienten Ausschluss von toxischem Natrium begründet zu sein, der unter anderem durch PdSOS1 vermittelt werden könnte. Außerdem erscheint die Aufrechterhaltung eines hohen K^+/Na^+ -Verhältnisses, möglicherweise durch hohe Kaliumaufnahmeleistungen, eine ebenso wichtige Rolle zu spielen.

4.4 Die Funktion der Blasenhaare von *Chenopodium quinoa*

Dattelpalmen sind nach den Ergebnissen der hier durchgeführten Untersuchungen sogenannte Exkluder, also Pflanzen, die die Aufnahme von überschüssigem Natrium zumindest in oberirdische, photosynthetisch aktive Teile vermeiden. Im Gegensatz dazu nimmt Quinoa Natrium auf und bedient sich zumindest teilweise anderer Mechanismen, die das Wachstum auf salzhaltigen Böden erlauben. *Chenopodium quinoa* besitzt spezialisierte Trichome, die sogenannten Blasenhaare auf der Epidermis (EBCs). Die Funktion solcher Blasenhaare als externe Salzspeicher wird schon seit längerem in Zusammenhang mit der Salztoleranz von EBC-tragenden Pflanzen diskutiert (Shabala et al. 2014; Barkla et al. 2016; Ruiz et al. 2016).

Überraschenderweise ergaben mRNA-Sequenzierungen von EBCs und Blattgewebe unter Salzstressbedingungen, das Salzstress nur zu geringen Veränderungen des Transkriptomts beider Gewebe führte (Tabelle 3-3). Allerdings fiel bereits unter Kontrollbedingungen die differentielle Expression, vor allem von Plasma- und Vakuolenmembran lokalisierten Transportproteinen, auf (Abbildung 3-15). Daher wurde zunächst die Natriumakkumulation in Quinoa unter Salzstress sowie die Identität von Transportproteinen, die an der Aufnahme und Verteilung des Natriums beteiligt sein könnten, untersucht.

4.4.1 Natriumgehalt und Natriumaufnahme in EBCs

Während in EBCs des gemeinen Eiskrauts (*M. crystallinum*) und *Atriplex halimus* die Akkumulation von Na⁺ unter Salzstress schon mehrfach nachgewiesen wurde (Adams et al. 1998; Barkla et al. 2016; Pan et al. 2016), sind Belege für die Natriumaufnahme der EBCs von Quinoa bislang hauptsächlich indirekt. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass konsequentes Entfernen der EBCs bei Quinoa in einem salzsensitiven Phänotyp resultiert und dass die Natriumkonzentration im Blattgewebe unter Salzstress durch das dauerhafte Entfernen der EBCs um bis zu 60% höher war als in Pflanzen mit intakten EBCs (Kiani-Pouya et al. 2017). Deshalb wurde in der hier vorliegenden Arbeit der Natriumgehalt der EBCs von Quinoa bei Salzstress flammenphotometrisch bestimmt und mit dem von Blattgewebe verglichen (siehe 3.3.4).

Am stärksten akkumulierte Natrium in adulten Blättern, wobei das Entfernen der EBCs unmittelbar vor der Ernte keinen Einfluss auf die gemessene Natriumkonzentration hatte. Die Dichte intakter EBCs nimmt bei Quinoa mit zunehmendem Blattalter ab (Orsini et al. 2011). Dies entspricht der grundsätzlichen Verteilung von Trichomen, die bereits im juvenilen Stadium von Blättern angelegt werden und durch die Blattvergrößerung während des Wachstums weniger dicht beieinanderstehen. Die EBCs scheinen daher vor allem dem Schutz sehr junger, stark photosynthetisch aktiver Blätter zu dienen. Mittels flammenphotometrischer Messungen des Natriumgehalts von isolierten EBCs juveniler Blätter konnte eindeutig gezeigt werden, dass die EBCs unter Salzstress Natrium aufnehmen. Bezogen auf das Trockengewicht, war die Akkumulation in Blattgewebe und EBCs vergleichbar (Abbildung 3-14). Das über die Wurzeln aufgenommene Natrium wird in Quinoa, anders als in Dattelpalmen, also durchaus in die oberirdischen Pflanzenteile aufgenommen und ein Teil dieses Natriums gelangt in die EBCs junger Blätter. Eine Aufkonzentrierung in den EBCs gegenüber dem restlichen Blattgewebe bei Salzstress blieb allerdings aus. Ähnliche Ergebnisse lieferte auch eine Studie von Orsini et al. (2011). Doch aufgrund der enormen Größe der EBCs im Vergleich zu anderen Epidermiszellen (ca. zehnfach größerer Durchmesser) und dem daraus resultierenden rund 1000fach größeren Volumen, können diese Zellen aber selbst bei einer Beladung mit Natrium

in einer zu Epidermiszellen vergleichbaren Konzentration ungefähr 1000mal mehr dieser Ionen aufnehmen. Die EBCs stellen so trotzdem einen effizienten Speicherort für überschüssiges NaCl unter Salzstressbedingungen dar (Shabala et al. 2014).

Im Rahmen dieser Arbeit sollten nun Transportproteine identifiziert werden, die an der Beladung der EBCs, vor allem mit Natrium, beteiligt sein könnten. Der gerichtete Transport von Natrium-Ionen in die EBCs erfordert eine polare Anordnung von Transportproteinen innerhalb des Blasenhaar-Komplexes (Shabala et al. 2014). Deshalb wurde spezifisch mRNA aus EBCs isoliert und mit dem Transkriptom von Blattgewebe verglichen. Durch RNA-Sequenzierung konnten mehrere putative Na⁺-Transportproteine identifiziert werden, die in EBCs im Vergleich zu Blattgewebe differentiell exprimiert vorkamen.

Bereits 2014 postulierten Shabala und Kollegen die Beteiligung von Mitgliedern der HKT1-Familie am unidirektionalen Transport von Natrium in die EBCs hinein. Tatsächlich konnte die differentielle Expression zweier HKT1-Orthologe in Quinoa EBCs sowohl mittels RNA-Sequenzierungen als auch durch qPCR nachgewiesen werden (Abbildung 3-16). Während CqHKT1.1 ausschließlich in Wurzeln zu finden war, wurde CqHKT1.2 in Blattgewebe und vor allem in EBCs exprimiert. HKTs der Untergruppe I sind überwiegend als Na⁺-Kanäle beschrieben, deren Funktion *in planta* bis heute umstritten ist (Waters et al. 2013). Die elektrophysiologische Charakterisierung der beiden Quinoa HKT-Orthologe in *Xenopus* Eizellen zeigte eine strikte Natrium-Selektivität beider HKTs und eine spannungsabhängige Aktivierungskinetik von CqHKT1.2. Es konnte auch gezeigt werden, dass CqHKT1.2 bei depolarisierten Membranspannungen deaktiviert (Böhm*, Messerer*; Müller* et. al, 2018). Eine ähnliche Aktivierungskinetik konnte bereits für verschiedene Allelvarianten von HKT1-Orthologen aus Reis nachgewiesen werden (Campbell et al. 2017). In Reis führte die Expression des deaktivierenden HKT1-Orthologs zu einer insgesamt niedrigeren Natriumaufnahme in das Wurzelgewebe (Campbell et al. 2017). Auch in EBCs von Quinoa führt die Deaktivierung von CqHKT1.2 zu einer verminderten Natriumaufnahme bei depolarisierten Membranspannungen. Dies steht aber nicht im Gegensatz zu der Rolle der EBCs als externe Salzspeicher. Depolarisiert die Membran der EBCs durch schnell steigende, zytosolische Natriumkonzentrationen, kann so ein Efflux von Natrium aus den EBCs verhindert werden (Böhm*, Messerer*, Müller* et al. 2018). Auch die sehr geringe Expression von CqSOS1 in EBCs von Quinoa (Abbildung 3-16) unterstützt deren Rolle als externe Salzspeicher. SOS1 wurde in verschiedenen Pflanzen überwiegend als Natrium-Export vermittelndes Protein beschrieben. Eine hohe Expression und der damit verbundene Export von Natrium aus den EBCs würde der Speicherfunktion dieser hochspezialisierten Zellen entgegenstehen. Ein Natriumexport durch das SOS-Transportsystem aus Zellen anderer

Gewebe, wie den Wurzelepidermiszellen oder den Mesophyllzellen, ist für Pflanzen bei Salzstress allerdings von Vorteil (Oh et al. 2007). Die Expression von CqSOS1 in Wurzel- und Blattgewebe deutet darauf hin, dass auch Quinoa sich dieser Mechanismen bedient. Es konnte gezeigt werden, dass Mesophyllzellen salztoleranter Quinoa Kultivare, verglichen mit sensitiven Kultivaren, einen gesteigerten und wahrscheinlich durch CqSOS1 vermittelten Na⁺-Efflux aufweisen (Bonales-Alatorre et al. 2013). Zusätzlich konnte eine andere Studie mit unterschiedlich salztoleranten Quinoa Kultivaren die gesteigerte Salztoleranz einiger Kultivare mit einer stärkeren Induktion von CqSOS1 im Mesophyllgewebe korrelieren (Ruiz et al. 2017). In der hier durchgeführten Studie konnte allerdings keine Induktion von CqSOS1 nachgewiesen werden und interessanterweise wies auch keines der anderen, mit Natriumtransport assoziierten Transkripte in den qPCR-Messungen eine Salzabhängigkeit auf (Abbildung 3-16). Die EBCs von Quinoa scheinen demnach also bereits unter Kontrollbedingungen über ausreichend Natrium-Transportsysteme zu verfügen, die bei auftretendem Salzstress unmittelbar den Natrium-Import in EBCs vermitteln können.

4.4.2 Kalium und Kaliumaufnahme in EBCs

Ähnlich wie in Dattelpalmen, hatte die Salzbehandlung auch in Quinoa keinen negativen Einfluss auf den Kaliumgehalt der Pflanzen (Abbildung 3-14). Allerdings war der gemessene Wert bezogen auf das Trockengewicht, selbst für pflanzliches Gewebe mit rund 700mg/g TG in den EBCs außergewöhnlich hoch. Auch in anderen Studien wies das Blattgewebe von Quinoa einen sehr hohen Kaliumgehalt auf (Orsini et al. 2011; Hariadi et al. 2011). Besonders die dort im Presssaft gemessenen Kaliumkonzentrationen stimmen sehr gut mit den 300-600mM Kalium aus dieser Studie überein. Kalium ist das am häufigsten in Pflanzen vorkommende anorganische Kation und die zytosolische Konzentration der meisten Pflanzen liegt typischerweise bei etwa 100mM (Clarkson und Hanson 1980). Auch wenn die Konzentration von Presssaft nicht genau der zytosolischen Konzentration entspricht, so liefert sie doch Hinweise auf die osmotischen Verhältnisse des Gewebes. Die Kaliumkonzentration von Quinoa ist ausreichend hoch um rein rechnerisch, für rund 80% der Osmolarität des Presssafts verantwortlich zu sein (Hariadi et al. 2011). Darüber hinaus konnten einige Studien in Quinoa sogar eine Zunahme des Kaliumgehalts durch Salzstress nachweisen (Hariadi et al. 2011; Kiani-Pouya et al. 2017). Um die zugrunde liegenden Transportvorgänge besser zu verstehen, wurde das Transkriptom von EBCs nach Kalium-Transportproteinen durchsucht. Von allen zwischen EBCs und Blattgewebe differentiell exprimierten Transportproteinen stellten allein die Kalium-Transportproteine 5% (Abbildung 3-15). Besonders die Eigenschaften sowie die expressionelle Regulation hochaffiner Kalium-Transportproteine der HAK/KUP/KT-Familie wird in einigen Studien mit einer gesteigerten Salztoleranz in

Verbindung gebracht (Su et al 2001; Su et al. 2002; Rubio et al. 2009a). So konnte eine umfangreiche Studie über die differentielle Expression von vier HAK/KUP/KT-Mitgliedern des halophytischen Eiskrauts zeigen, dass Salzstress die Expression aller untersuchten HAK/KUP/KTs induzierte (Su et al. 2002). In der salzsensitiven Arabidopsis dagegen wird der überwiegend in Wurzeln exprimierte Kaliumtransporter AtHAK5 (Rubio et al. 2000) durch Salzstress reprimiert (Aleman et al. 2009a).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte auch für Quinoa die differentielle Expression zweier HAK-Orthologe nachgewiesen werden (Abbildung 3-18 A und B). Der putative, hochaffine Kaliumtransporter CqHAK5 war, wie auch in Arabidopsis, ausschließlich in Wurzeln exprimiert und Salzstress führte zu einer deutlichen Abnahme der Transkriptmenge in diesem Gewebe (Abbildung 3-18 A). Im Gegensatz dazu konnte für einen anderen putativen, hochaffinen Kaliumtransporter der HAK/KUP/KT-Familie eine salzunabhängige Expression, vor allem in EBCs, nachgewiesen werden (Abbildung 3-18 B). Außerdem konnte mittlerweile durch die heterologe Expression eines CqHAK-Orthologs in *Xenopus* Eizellen die Protonen-gekoppelte hochaffine Kaliumaufnahme mit einem K_m -Wert von rund 50 μM und gleichzeitig die verschwindend geringe Leitfähigkeit für Na^+ dieses CqHAK-Orthologs nachgewiesen werden (Böhm*, Messerer*, Müller* et al. 2018). Die salzunabhängige hohe Expression des CqHAK6 in EBCs (Abbildung 3-18) sowie die elektrophysiologischen Eigenschaften von HAK deuten zusammengenommen darauf hin, dass die Kaliumaufnahme in EBCs von Quinoa durch diesen Transporter vermittelt wird, um so das Membranpotential und die zytoplasmatische Ionenhomöostase auch bei erhöhter Natriumkonzentration aufrecht zu erhalten (Böhm*, Messerer*, Müller* et al. 2018).

4.4.3 Die Aufnahme von Anionen in EBCs

Um das Membranpotential der Zellen aufrecht zu erhalten, müssen Ionenverschiebungen über biologische Membranen elektrisch neutral sein (Hille 2001). Erhöhte Kationenkonzentrationen im Zytoplasma bzw. der Vakuole durch erhöhtes Natrium oder Kalium müssen entweder durch die Abgabe anderer positiv geladener Teilchen oder die Aufnahme von Anionen ausgeglichen werden. Und auch wenn die Chloridkonzentration in Quinoa in der hier vorliegenden Studie nicht direkt bestimmt wurde, so kann doch davon ausgegangen werden, dass steigende NaCl-Konzentrationen im Boden auch zu einer Erhöhung der Chloridkonzentrationen innerhalb der Gewebe von Quinoa führt. An *M. crystallinum* konnte gezeigt werden, dass unter Salzstress Chlorid in EBCs sogar stärker als Na^+ akkumuliert (Barkla et al. 2016). Auch für die EBCs von Quinoa konnte bereits eine Chloridaufnahme nachgewiesen werden (Orsini et al. 2011).

Mögliche Transportproteine, die den Chloridtransport innerhalb des Blasenhaar-Komplexes vermitteln könnten, sowie deren Anordnung wurden bereits 2014 von Shabala et al. vorgeschlagen. Chlorid-leitende Kanäle der SLAC/SLAH-Familie könnten demnach den passiven Efflux von Chlorid aus den Epidermiszellen sowie den Stielzellen vermitteln, während der energieaufwändige Import von Chlorid entgegen des elektrochemischen Gradienten in die EBCs durch pH-abhängige Chloridtransporter der NPF/NRT-Familie vermittelt werden könnte. Die mRNA-Sequenzierungen der Quinoa EBCs ergaben eine Reihe von differentiell exprimierten Chlorid-Transportproteinen im Vergleich zum Blattgewebe (Abbildung 3-15, Tabelle S1 C, Anhang D (6.4)). In EBCs konnte auch die hohe Expression eines CqSLAH3-Homolog nachgewiesen werden, welches zwar in Wurzel- und Blattgewebe durch Salzstress reprimiert wurde, in EBCs aber nicht (Abbildung 3-17). Bei allen bislang beschriebenen SLAC/SLAHs handelt es sich um Plasmamembran-lokalisierte Anionenkanäle, die einen Transport nur entlang eines elektrochemischen Gradienten vermitteln können (Hedrich und Geiger 2017). Die Aktivität solch eines Chlorid-Kanals wie SLAH3 in EBCs könnte aufgrund der negativen Membranspannung sowie ungünstiger Chloridverhältnisse, also einer hohen Cl⁻ Konzentration im Zytoplasma der EBCs, zu einem Ausstrom von Chlorid führen. In Arabidopsis wird SLAH3 unter anderem in Schließzellen (Geiger et al. 2011) und im Wurzelgewebe exprimiert (Cubero-Font et al. 2016). AtSLAH3 wird nitratabhängig und durch Kalzium-abhängige Proteinkinasen aktiviert und weist eine höhere Nitrat- als Chloridleitfähigkeit auf (Geiger et al. 2011). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Selektivität von AtSLAH3 zu Gunsten von Chlorid durch die Anwesenheit von AtSLAH1 moduliert werden kann (Cubero-Font et al. 2016). Im Gegensatz zu CqSLAH3 konnte kein Effekt von Salzstress auf die Expression von AtSLAH3 in Wurzeln von Arabidopsis nachgewiesen werden (Cubero-Font et al. 2016), was möglicherweise auf unterschiedliche Funktionen beider SLAH3-Homologe hindeutet. Inwieweit also die Eigenschaften anderer SLAHs auf den hier gefundenen CqSLAH3 übertragbar sind, ist unklar und um die Funktion von CqSLAH3 in Quinoa EBCs zu entschlüsseln, reichen Expressionsanalysen allein nicht aus. Es bedarf weiterführender Untersuchungen, vor allem der elektrophysiologischen Eigenschaften von CqSLAH3, um dessen Funktion in EBCs besser zu verstehen.

Ein Mechanismus mit dem Pflanzen die Konzentration von toxischen Ionen im Zytoplasma gering halten können, ist die Kompartimentierung der überschüssigen Ionen in die Vakuolen (Munns und Tester 2008; Shabala 2013). Tatsächlich konnte sowohl die Akkumulation von Natrium als auch die von Chlorid in Vakuolen bei Salzstress für verschiedene Arten, einschließlich *C. quinoa*, nachgewiesen werden (Koyro und Stelzer 1988; Bonales-Alatorre et al. 2013; Abbaspour et al. 2013; Wu et al. 2015). In Arabidopsis konnte die Beteiligung von AtCLC-c und AtCLC-g, beides im Tonoplasten lokalisierte Anionen-Transportproteine, an der

Aufrechterhaltung der Chloridhomöostase unter Salzstress gezeigt werden (Jossier et al. 2010; Nguyen et al. 2016). Das Arabidopsis Genom kodiert insgesamt für sieben CLCs (Lv et al. 2009). Im Transkriptom von Quinoa konnten sogar 23 CIC-Orthologe identifiziert werden (Tabelle S1 A; Anhang D (6.4)) und qPCR-Messungen bestätigten die sehr hohe Expression von CqCLC-c in EBCs (Abbildung 3-17). Für AtCLC-a (De Angeli et al. 2006), AtCLC-c (Jossier et al. 2010) und AtCLC-g (Nguyen et al. 2016) konnte die Lokalisation im Tonoplasten belegt werden und auch für den hier beschriebenen, in EBCs von Quinoa sehr hoch exprimierten CqCLC-c, konnte die Lokalisation in der Vakuole gezeigt werden (Böhm*, Messerer*, Müller* et al. 2018). Patchclamp-Messungen an CqCLC-c exprimierenden Arabidopsis Vakuolen zeigten außerdem eine hohe Chloridleitfähigkeit, was zusammen mit der hohen Expression in EBCs auf eine zentrale Funktion von CqCLC-c an der Beladung der Vakuolen der EBCs von Quinoa mit Chlorid hindeutet (Böhm*, Messer*, Müller* et al. 2018).

4.4.4 Import von kompatiblen Soluten in EBCs

Salzstress induziert in vielen toleranten Arten die Akkumulation von kompatiblen Soluten (Verbruggen und Hermans 2008; Flowers et al. 2015; Kumari et al. 2015), denen vor allem eine adaptive Funktion in der Osmoregulation sowie beim Schutz von Proteinen vor ROS zugeschrieben wird. Pflanzen nutzen Zucker, Zuckerderivate, methylierte quartäre Stickstoffverbindungen und Aminosäuren als kompatible Solute (Chen und Jiang 2010). Frühere Studien zeigten, dass Salzstress im Blattgewebe von Quinoa vor allem zu einer Zunahme der Prolinkonzentration führt (Ruffino et al. 2010; Kiani-Pouya et al. 2017) und für das Eiskraut konnte, neben der Akkumulation von Prolin in Blatt- und Wurzelgewebe (Thomas und Bohnert 1993), sogar eine starke Zunahme direkt in EBCs nachgewiesen werden (Barkla und Vera-Estrella 2015). Einer der wesentlichen Schritte in der Prolinsynthese ist die Umwandlung von Glutamat in Pyrrolin-5-Carboxylat durch die P5C-Synthasen (Kishor und Sreenivasulu 2014). In EBCs des Eiskrauts kam es, neben dem Anstieg der Prolinkonzentration, auch zu einer Zunahme der P5CS-Transkripte (Oh et al. 2015). Auch im Transkriptom von Quinoa Blättern und EBCs konnten drei P5CS2-Orthologe identifiziert werden, deren Expression nur in Blättern, nicht aber in EBCs durch Salzstress induziert wurde (Tabelle S1 A, Anhang D (6.4)). qPCR-Messungen eines dieser CqP5CS2-Orthologe zeigten darüber hinaus eine starke Induktion im Wurzel- und Blattgewebe durch Salzstress (Abbildung 3-18). Dieses Expressionsmuster deutet darauf hin, dass die Prolinsynthese in Quinoa vor allem in Wurzeln und im Blattgewebe stattfindet und nicht in den EBCs selbst.

Prolin wird in Pflanzen aber auch zwischen verschiedenen Geweben transportiert und für einige Arten ist ein Prolinsynthese-unabhängiger Anstieg der Prolinkonzentration bestimmter Gewebe belegt (Verslues und Sharp 1999; Lehmann et al. 2010). In Pflanzen sind mehrere

Gruppen von Aminosäure-Transportproteinen bekannt, die Prolin als Substrat erkennen (Lehmann et al. 2010) und von allen zwischen EBCs und Blattgewebe differentiell exprimierten Transportproteinen stellten die als Aminosäuretransporter klassifizierten Transkripte in den RNA-Sequenzierungen allein 20% (Abbildung 3-15). Unter diesen waren auch mehrere Mitglieder der Prolintransporter-Superfamilie (ProT), von welchen einer besonders hoch und salzunabhängig in EBCs exprimiert wurde (Abbildung 3-18). Die elektrophysiologische Charakterisierung dieses CqProTs in *Xenopus* Eizellen zeigte, dass dieser Plasmamembran-lokalisierte CqProT Prolin, aber auch γ -Aminobuttersäure (GABA) als Substrat erkennt und pH-abhängig transportiert (Böhm*, Messerer*, Müller* et al. 2018). GABA ist wie Prolin eine nicht proteinogene Aminosäure und auch Prolintransporter anderer Pflanzen weisen eine Leitfähigkeit für GABA auf (Breitkreuz et al. 1999; Schwacke et al. 1999). Neuere Studien konnten zeigen, dass GABA die Leitfähigkeit von Ionenkanälen modulieren kann (Ramesh et al. 2015). So könnte die hohe Expression von CqProT zum einen die Aufnahme von Prolin zur osmotischen Adaption und zum anderen die Aufnahme von GABA vermitteln, was wiederum die Aktivität anderer Transportproteine der EBCs regulieren könnte.

4.4.5 Energiehaushalt in EBCs

Viele der an der Beladung der EBCs beteiligten Transportvorgänge sind energieaufwändig (siehe 1.6.2 bis 1.6.4). Um die Energiegewinnung von EBCs besser zu verstehen, wurden die Ergebnisse der RNA-Sequenzierung nach Unterschieden in wesentlichen Stoffwechselwegen durchsucht. Dabei wurden deutliche Unterschiede zwischen EBCs und Blattgewebe sowohl in anabolischen als auch katabolischen Stoffwechselwegen gefunden wurden (Tabelle 3-4). Besonders auffällig waren die Unterschiede in der Expression Photosynthese-assoziiierter Transkripte zwischen EBCs und Blattgewebe, die in EBCs grundsätzlich niedriger waren als im Blattgewebe (Tabelle 3-4). Die größten Unterschiede fanden sich dabei in der Expressionsstärke von Komponenten der Lichtreaktion der Photosynthese, die in der Thylakoidmembran lokalisiert sind. Sämtliche als Lichtsammelkomplex (LHC) annotierten Transkripte waren in EBCs deutlich niedriger exprimiert als im Blattgewebe (Abbildung 3-19), was auf eine eher untergeordnete Rolle der Energiegewinnung durch Photosynthese schließen lässt. Auch die EBCs von *M. crystallinum* enthalten zwar funktionelle Chloroplasten, aber auch deren Rolle an der Gesamt-Photosyntheseleistung der Pflanzen scheint eher untergeordnet zu sein (Barkla et al. 2012; Barkla et al. 2016). Frühe morphologische Untersuchungen der Blasenhaare verschiedener Arten der *Chenopodiaceae* zeigten, dass die EBCs selbst nur sehr wenige und in einigen Arten gar keine Chloroplasten enthalten (Reimann und Breckle 1988). Elektronenmikroskopische Untersuchungen der EBCs der in dieser Studie verwendeten Quinoas konnten diese frühen Ergebnisse bestätigen und zeigten, dass zwar die

Gesamtzahl von Chloroplasten in EBCs und Mesophyllzellen vergleichbar ist, durch die enorme Größe der EBCs aber die Dichte an Chloroplasten in EBCs sehr viel kleiner ist als im Mesophyllgewebe (Böhm*, Messerer*, Müller* et al. 2018). Zusätzlich wurde in den Daten der RNA-Sequenzierung eine große Anzahl an EBC-exprimierten Zuckertransportern identifiziert. Passend dazu waren in EBCs im Vergleich zum Blattgewebe katabolische Stoffwechselwege deutlich induziert (Tabelle 3-4). 37% aller mit dem Citrat-Zyklus und 55% der mit dem Fettsäurestoffwechsel assoziierten Transkripte waren höher in EBCs als im Blatt exprimiert (Tabelle 3-4).

Zusammengenommen deutet das Transkriptom der EBCs sowie die geringe Chloroplastendichte auf einen heterotrophen Zellstoffwechsel der EBCs hin, in dem die Energiegewinnung hauptsächlich durch den mitochondrialen Citrat-Zyklus und die Atmungskette gewährleistet wird.

4.4.6 Ausblick

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Salztoleranz von Dattelpalmen und Quinoa zwei verschiedene Strategien zu Grunde liegen. Quinoa nutzt, ähnlich wie *M. crystallinum*, die EBCs um dort das über die Wurzeln aufgenommene überschüssige Natrium und vermutlich auch Chlorid zu speichern und so negative Auswirkungen im Mesophyll zu verhindern. Auch wenn ein Teil der daran beteiligten Transportproteine bereits charakterisiert ist (Böhm*, Messerer*, Müller* et al. 2018), sind die Transportvorgänge bei weitem nicht vollständig entschlüsselt. Es besteht immer noch Bedarf das Bild der an der Natriumbeladung beteiligten Transportvorgänge in die EBCs zu vervollständigen. Darüber hinaus fehlen Daten zur Chlorid-Aufnahme und Speicherung noch gänzlich. Die Bestimmung des Chloridgehalts der EBCs sowie eine Charakterisierung von an der Chlorid-Homöostase beteiligten Anionenkanälen ist zwingend notwendig, um die Salztoleranz von Quinoa genau zu verstehen und dieses Wissen auf andere Nutzpflanzen anwenden zu können. Auch ein Vergleich der Eigenschaften von Transportproteinen unterschiedlicher Quinoa Kultivare, die sich in der Ausprägung ihrer Salztoleranz unterscheiden, könnte hilfreich sein. So könnten kleine Unterschiede in den Aminosäuresequenzen identifiziert werden (SNPs), die Auswirkungen auf die Leitfähigkeiten der Transportproteine haben und so eine höhere Toleranz vermitteln.

Im Gegensatz zu Quinoa nehmen Dattelpalmen kein Natrium in oberirdische, photosynthetisch aktive Pflanzenteile auf. Wie genau der Ausschluss von Natrium aber vermittelt wird und ob Datteln auch für Chlorid über solch einen Mechanismus verfügen, bleibt Gegenstand aktueller Forschungen. Transkriptom-Analysen verschiedener Zonen der Wurzeln von Dattelpalmen könnten helfen Transportproteine zu identifizieren, die solch einen effizienten Ausschluss vermitteln können. Neue Methoden, wie z.B. die Genom-Editierung durch das CRISPER/CAS-

System (Cong et al. 2013) erlauben darüber hinaus gezielt einzelne Gene zu mutieren und ist auch an bislang nicht-transformierbaren Pflanzen anwendbar. Der Einsatz solcher Werkzeuge zur Erzeugung von Quinoa- und Dattelpalmen-Mutanten könnte auch die Untersuchung der Funktion solcher Transportsysteme *in planta* ermöglichen.

5. Literaturverzeichnis

Reference List

- Abbas MF, Jasim AM, Shareef HJ (2015) Role of Sulphur in salinity tolerance of Date Palm (*Phoenix dactylifera* L.) offshoots cvs. Berhi and Sayer.
- Abbaspour N, Kaiser B, Tyerman S (2013) Chloride transport and compartmentation within main and lateral roots of two grapevine rootstocks differing in salt tolerance. *Trees-Struct Funct* 27 (5):1317-1325. doi:10.1007/s00468-013-0880-2
- Ache P, Becker D, Ivashikina N, Dietrich P, Roelfsema MRG, Hedrich R (2000) GORK, a delayed outward rectifier expressed in guard cells of *Arabidopsis thaliana*, is a K⁺-selective, K⁺-sensing ion channel. *Febs Lett* 486 (2):93-98. doi:10.1016/S0014-5793(00)02248-1
- Adams P, Nelson DE, Yamada S, Chmara W, Jensen RG, Bohnert HJ, Griffiths H (1998) Growth and development of *Mesembryanthemum crystallinum* (Aizoaceae). *New Phytol* 138 (2):171-190. doi:10.1046/j.1469-8137.1998.00111.x
- Agarie S, Shimoda T, Shimizu Y, Baumann K, Sunagawa H, Kondo A, Ueno O, Nakahara T, Nose A, Cushman JC (2007) Salt tolerance, salt accumulation, and ionic homeostasis in an epidermal bladder-cell-less mutant of the common ice plant *Mesembryanthemum crystallinum*. *J Exp Bot* 58 (8):1957-1967. doi:10.1093/jxb/erm057
- Ahmad I, Maathuis FJM (2014) Cellular and tissue distribution of potassium: Physiological relevance, mechanisms and regulation. *J Plant Physiol* 171 (9):708-714. doi:10.1016/j.jplph.2013.10.016
- Al-Dous EK, George B, Al-Mahmoud ME, Al-Jaber MY, Wang H, Salameh YM, Al-Azwani EK, Chaluvadi S, Pontaroli AC, DeBarry J, Arondel V, Ohlrogge J, Saie IJ, Suliman-Elmeer KM, Bennetzen JL, Kruegger RR, Malek JA (2011) De novo genome sequencing and comparative genomics of date palm (*Phoenix dactylifera*). *Nat Biotechnol* 29 (6):521-524. doi:10.1038/nbt.1860
- Al-Khayri JM, Al-Bahrany AM (2004) Growth, water content, and proline accumulation in drought-stressed callus of date palm. *Biol Plantarum* 48 (1):105-108. doi:10.1023/B:BIOP.0000024283.74919.4c
- Al-Mssallem IS, Hu SN, Zhang XW, Lin Q, Liu WF, Tan J, Yu XG, Liu JC, Pan LL, Zhang TW, Yin YX, Xin CQ, Wu H, Zhang GY, Abdullah MMB, Huang DW, Fang YJ, Alnakhli YO, Jia SG, Yin A, Alhuzimi EM, Alsaihati BA, Al-Owayyed SA, Zhao DJ, Zhang S, Al-Otaibi NA, Sun GY, Majrashi MA, Li FS, Tala, Wang JX, Yun QZ, Alnassar NA, Wang L, Yang M, Al-Jelaify RF, Liu K, Gao SH, Chen KF, Alkhalidi SR, Liu GM, Zhang M, Guo HY, Yu J (2013) Genome sequence of the date palm *Phoenix dactylifera* L. *Nat Commun* 4. doi:10.1038/ncomms3274
- Al Kharusi L, Assaha DVM, Al-Yahyai R, Yaish MW (2017) Screening of Date Palm (*Phoenix dactylifera* L.) Cultivars for Salinity Tolerance. *Forests* 8 (4). doi:10.3390/f8040136
- Aleman F, Nieves-Cordones M, Martinez V, Rubio F (2009a) Differential regulation of the HAK5 genes encoding the high-affinity K⁺ transporters of *Thellungiella halophila* and *Arabidopsis thaliana*. *Environ Exp Bot* 65 (2-3):263-269. doi:10.1016/j.envexpbot.2008.09.011
- Aleman F, Nieves-Cordones M, Martinez V, Rubio F (2009b) Potassium/sodium steady-state homeostasis in *Thellungiella halophila* and *Arabidopsis thaliana* under long-term salinity conditions. *Plant Sci* 176 (6):768-774. doi:10.1016/j.plantsci.2009.02.020
- Alhammedi MS, Edward GP (2009) Effect of Salinity on Growth of Twelve Cultivars of the United Arab Emirates Date Palm. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 40 (15-16):2372-2388. doi:10.1080/00103620903111293

- Alia, Pardha Saradhi P, Mohanty P (1997) Involvement of proline in protecting thylakoid membranes against free radical-induced photodamage. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 38 (2):253-257. doi:[https://doi.org/10.1016/S1011-1344\(96\)07470-2](https://doi.org/10.1016/S1011-1344(96)07470-2)
- Amtmann A, Armengaud P, Volkov V (2018) Potassium Nutrition and Salt Stress. In: Roberts JA (ed) *Annual Plant Reviews online*. doi:[doi:10.1002/9781119312994.apr0151](https://doi.org/10.1002/9781119312994.apr0151)
- Amtmann A, Wang B, Fricke W, Volkov V (2005) Comparative analysis of ion transport in Arabidopsis related species differing in salt tolerance. *Comp Biochem Phys A* 141 (3):S339-S339
- Anderson JM, Melis A (1983) Localization of different photosystems in separate regions of chloroplast membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 80 (3):745-749. doi:[10.1073/pnas.80.3.745](https://doi.org/10.1073/pnas.80.3.745)
- Antoni R, Gonzalez-Guzman M, Rodriguez L, Rodrigues A, Pizzio GA, Rodriguez PL (2012) Selective Inhibition of Clade A Phosphatases Type 2C by PYR/PYL/RCAR Abscisic Acid Receptors. *Plant Physiol* 158 (2):970-980. doi:[10.1104/pp.111.188623](https://doi.org/10.1104/pp.111.188623)
- Apse MP, Aharon GS, Snedden WA, Blumwald E (1999) Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na⁺/H⁺ antiport in Arabidopsis. *Science* 285 (5431):1256-1258. doi:[DOI 10.1126/science.285.5431.1256](https://doi.org/10.1126/science.285.5431.1256)
- Apse MP, Blumwald E (2007) Na⁺ transport in plants. *Febs Lett* 581 (12):2247-2254. doi:[10.1016/j.febslet.2007.04.014](https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.04.014)
- Arab L, Kreuzwieser J, Kruse J, Zimmer I, Ache P, Alfarraj S, Al-Rasheid KAS, Schnitzler JP, Hedrich R, Rennenberg H (2016) Acclimation to heat and drought-Lessons to learn from the date palm (*Phoenix dactylifera*). *Environ Exp Bot* 125:20-30. doi:[10.1016/j.envexpbot.2016.01.003](https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2016.01.003)
- Armond PA, Staehelin LA, Arntzen CJ (1977) Spatial relationship of photosystem I, photosystem II, and the light-harvesting complex in chloroplast membranes. *J Cell Biol* 73 (2):400-418
- Azeem F, Ahmad B, Atif RM, Ali MA, Nadeem H, Hussain S, Manzoor H, Azeem M, Afzal M (2018) Genome-Wide Analysis of Potassium Transport-Related Genes in Chickpea (*Cicer arietinum* L.) and Their Role in Abiotic Stress Responses. *Plant Mol Biol Rep* 36 (3):451-468. doi:[10.1007/s11105-018-1090-2](https://doi.org/10.1007/s11105-018-1090-2)
- Baetz U, Eisenach C, Tohge T, Martinoia E, De Angeli A (2016) Vacuolar Chloride Fluxes Impact Ion Content and Distribution during Early Salinity Stress. *Plant Physiol* 172 (2):1167-1181. doi:[10.1104/pp.16.00183](https://doi.org/10.1104/pp.16.00183)
- Bai G, Yang DH, Zhao Y, Ha S, Yang F, Ma J, Gao XS, Wang ZM, Zhu JK (2013) Interactions between soybean ABA receptors and type 2C protein phosphatases. *Plant Mol Biol* 83 (6):651-664. doi:[10.1007/s11103-013-0114-4](https://doi.org/10.1007/s11103-013-0114-4)
- Baltimore D (1970) RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses. *Nature* 226 (5252):1209-1211
- Barbier-Brygoo H, De Angeli A, Filleur S, Frachisse JM, Gambale F, Thomine S, Wege S (2011) Anion Channels/Transporters in Plants: From Molecular Bases to Regulatory Networks. *Annual Review of Plant Biology*, Vol 62 62:25-51. doi:[10.1146/annurev-arplant-042110-103741](https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042110-103741)
- Barkla BJ, Vera-Estrella R (2015) Single cell-type comparative metabolomics of epidermal bladder cells from the halophyte *Mesembryanthemum crystallinum*. *Frontiers in Plant Science* 6. doi:[ARTN 435 10.3389/fpls.2015.00435](https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00435)
- Barkla BJ, Vera-Estrella R, Pantoja O (2012) Protein profiling of epidermal bladder cells from the halophyte *Mesembryanthemum crystallinum*. *Proteomics* 12 (18):2862-2865. doi:[10.1002/pmic.201200152](https://doi.org/10.1002/pmic.201200152)

- Barkla BJ, Vera-Estrella R, Raymond C (2016) Single-cell-type quantitative proteomic and ionic analysis of epidermal bladder cells from the halophyte model plant *Mesembryanthemum crystallinum* to identify salt-responsive proteins. *Bmc Plant Biol* 16. doi:ARTN 110
10.1186/s12870-016-0797-1
- Barthlott W, Neinhuis C, Cutler D, Ditsch F, Meusel I, Theisen I, Wilhelmi H (1998) Classification and terminology of plant epicuticular waxes. *Bot J Linn Soc* 126 (3):237-260. doi:DOI 10.1111/j.1095-8339.1998.tb02529.x
- Bassil E, Blumwald E (2014) The ins and outs of intracellular ion homeostasis: NHX-type cation/H⁺ transporters. *Curr Opin Plant Biol* 22:1-6. doi:10.1016/j.pbi.2014.08.002
- Batelli G, Verslues PE, Agius F, Qiu Q, Fujii H, Pan S, Schumaker KS, Grillo S, Zhu JK (2007) SOS2 promotes salt tolerance in part by interacting with the vacuolar H⁺-ATPase and upregulating its transport activity. *Mol Cell Biol* 27 (22):7781-7790. doi:10.1128/Mcb.00430-07
- Bauer H, Ache P, Lautner S, Fromm J, Hartung W, Al-Rasheid KAS, Sonnewald S, Sonnewald U, Kneitz S, Lachmann N, Mendel RR, Bittner F, Hetherington AM, Hedrich R (2013) The Stomatal Response to Reduced Relative Humidity Requires Guard Cell-Autonomous ABA Synthesis. *Curr Biol* 23 (1):53-57. doi:10.1016/j.cub.2012.11.022
- Bendaly A, Messedi D, Smaoui A, Ksouri R, Bouchereau A, Abdely C (2016) Physiological and leaf metabolome changes in the xerohalophyte species *Atriplex halimus* induced by salinity. *Plant Physiol Bioch* 103:208-218. doi:10.1016/j.plaphy.2016.02.037
- Bhat NR, Suleiman MK, Lekha VS, Al-Mulla L, Ali SI, George P, Thomas B (2013) Application of biosaline agriculture strategies for sustainable plant production in Kuwait. *Journal of Agriculture and Biodiversity Research* 2:33-43
- Boekema EJ, van Breemen JF, van Roon H, Dekker JP (2000) Arrangement of photosystem II supercomplexes in crystalline macrodomains within the thylakoid membrane of green plant chloroplasts. *J Mol Biol* 301 (5):1123-1133. doi:10.1006/jmbi.2000.4037
- Bohm J, Messerer M, Muller HM, Scholz-Starke J, Gradogna A, Scherzer S, Maierhofer T, Bazihizina N, Zhang H, Stigloher C, Ache P, Al-Rasheid KAS, Mayer KFX, Shabala S, Carpaneto A, Haberer G, Zhu JK, Hedrich R (2018) Understanding the Molecular Basis of Salt Sequestration in Epidermal Bladder Cells of *Chenopodium quinoa*. *Curr Biol*. doi:10.1016/j.cub.2018.08.004
- Bohnert HJ, Nelson DE, Jensen RG (1995) Adaptations to Environmental Stresses. *Plant Cell* 7 (7):1099-1111. doi:DOI 10.1105/tpc.7.7.1099
- Bonales-Alatorre E, Pottosin I, Shabala L, Chen ZH, Zeng FR, Jacobsen SE, Shabala S (2013) Differential Activity of Plasma and Vacuolar Membrane Transporters Contributes to Genotypic Differences in Salinity Tolerance in a Halophyte Species, *Chenopodium quinoa*. *Int J Mol Sci* 14 (5):9267-9285. doi:10.3390/ijms14059267
- Botes A, Zaid A (2002) CHAPTER III: THE ECONOMIC IMPORTANCE OF DATE PRODUCTION AND INTERNATIONAL TRADE. *Date Palm Production*, vol 156.
- Boyer JS, Wong SC, Farquhar GD (1997) CO₂ and Vapor Water Exchange across Leaf Cuticle (Epidermis) at Various Water Potentials. *Plant physiology* 114 (1):185-191 doi:https://doi.org/10.1104/pp.114.1.185
- Breitkreuz KE, Shelp BJ, Fischer WN, Schwacke R, Rentsch D (1999) Identification and characterization of GABA, proline and quaternary ammonium compound transporters from *Arabidopsis thaliana*. *Febs Lett* 450 (3):280-284
- Brownlee C (2018) Stomatal Physiology: Cereal Successes. *Curr Biol* 28 (9):R551-R553. doi:10.1016/j.cub.2018.03.055
- Bruinsma J (2009) THE RESOURCE OUTLOOK TO 2050: BY HOW MUCH DO LAND, WATER AND CROP YIELDS NEED TO INCREASE BY 2050? Paper presented at the Expert Meeting on How to Feed the World in 2050, Rome,
- Brumos J, Talon M, Bouhlal R, Colmenero-Flores JM (2010) Cl⁻ homeostasis in includer and excluder citrus rootstocks: transport mechanisms and identification of candidate genes. *Plant Cell Environ* 33 (12):2012-2027. doi:10.1111/j.1365-3040.2010.02202.x

- Bueso E, Rodriguez L, Lorenzo-Orts L, Gonzalez-Guzman M, Sayas E, Munoz-Bertomeu J, Ibanez C, Serrano R, Rodriguez PL (2014) The single-subunit RING-type E3 ubiquitin ligase RSL1 targets PYL4 and PYR1 ABA receptors in plasma membrane to modulate abscisic acid signaling. *Plant J* 80 (6):1057-1071. doi:10.1111/tpj.12708
- Burns JA, Butler JC, Moran J, Whitesides GM (1991) Selective reduction of disulfides by tris(2-carboxyethyl)phosphine. *The Journal of Organic Chemistry* 56 (8):2648-2650. doi:10.1021/jo00008a014
- Campbell MT, Bandillo N, Al Shiblawi FRA, Sharma S, Liu K, Du Q, Schmitz AJ, Zhang C, Very AA, Lorenz AJ, Walia H (2017) Allelic variants of OsHKT1;1 underlie the divergence between indica and japonica subspecies of rice (*Oryza sativa*) for root sodium content. *Plos Genet* 13 (6). doi:ARTN e1006823 10.1371/journal.pgen.1006823
- Chang CR, Bowman JL, Meyerowitz EM (2016) Field Guide to Plant Model Systems. *Cell* 167 (2):325-339. doi:10.1016/j.cell.2016.08.031
- Chao CT, Krueger RR (2007) The date palm (*Phoenix dactylifera* L.): Overview of biology, uses, and cultivation. *Hortscience* 42 (5):1077-1082
- Chater C, Peng K, Movahedi M, Dunn JA, Walker HJ, Liang YK, McLachlan DH, Casson S, Isner JC, Wilson I, Neill SJ, Hedrich R, Gray JE, Hetherington AM (2015) Elevated CO₂-Induced Responses in Stomata Require ABA and ABA Signaling. *Curr Biol* 25 (20):2709-2716. doi:10.1016/j.cub.2015.09.013
- Cheeseman JM (2013) The integration of activity in saline environments: problems and perspectives. *Funct Plant Biol* 40 (8-9):759-774. doi:10.1071/Fp12285
- Chen H, Jiang JG (2010) Osmotic adjustment and plant adaptation to environmental changes related to drought and salinity. *Environ Rev* 18:309-319. doi:10.1139/A10-014
- Chen ZH, Chen G, Dai F, Wang Y, Hills A, Ruan YL, Zhang G, Franks PJ, Nevo E, Blatt MR (2017) Molecular Evolution of Grass Stomata. *Trends Plant Sci* 22 (2):124-139. doi:10.1016/j.tplants.2016.09.005
- Clarkson DT, Hanson JB (1980) The Mineral-Nutrition of Higher-Plants. *Annu Rev Plant Phys* 31:239-298. doi:DOI 10.1146/annurev.pp.31.060180.001323
- Colgan DF, Manley JL (1997) Mechanism and regulation of mRNA polyadenylation. *Genes Dev* 11 (21):2755-2766
- Cominelli E, Galbiati M, Vavasseur A, Conti L, Sala T, Vuylsteke M, Leonhardt N, Dellaporta SL, Tonelli C (2005) A guard-cell-specific MYB transcription factor regulates stomatal movements and plant drought tolerance. *Curr Biol* 15 (13):1196-1200. doi:10.1016/j.cub.2005.05.048
- Cong L, Ran FA, Cox D, Lin SL, Barretto R, Habib N, Hsu PD, Wu XB, Jiang WY, Marraffini LA, Zhang F (2013) Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems. *Science* 339 (6121):819-823. doi:10.1126/science.1231143
- Conn S, Gilliam M (2010) Comparative physiology of elemental distributions in plants. *Ann Bot-London* 105 (7):1081-1102. doi:10.1093/aob/mcq027
- Corratge-Faillie C, Lacombe B (2017) Substrate (un)specificity of Arabidopsis NRT1/PTR FAMILY (NPF) proteins. *J Exp Bot* 68 (12):3107-3113. doi:10.1093/jxb/erw499
- Cubero-Font P, Maierhofer T, Jaslan J, Rosales MA, Espartero J, Diaz-Rueda P, Muller HM, Hurter AL, Al-Rasheid KAS, Marten I, Hedrich R, Colmenero-Flores JM, Geiger D (2016) Silent S-Type Anion Channel Subunit SLAH1 Gates SLAH3 Open for Chloride Root-to-Shoot Translocation. *Curr Biol* 26 (16):2213-2220. doi:10.1016/j.cub.2016.06.045
- Cuin TA, Betts SA, Chalmandrier R, Shabala S (2008) A root's ability to retain K(+) correlates with salt tolerance in wheat. *J Exp Bot* 59 (10):2697-2706. doi:10.1093/jxb/ern128
- Cushman JC, Bohnert HJ (2000) Genomic approaches to plant stress tolerance. *Curr Opin Plant Biol* 3 (2):117-124. doi:Doi 10.1016/S1369-5266(99)00052-7

- Danquah A, de Zelicourt A, Boudsocq M, Neubauer J, Frei Dit Frey N, Leonhardt N, Pateyron S, Gwinner F, Tamby JP, Ortiz-Masia D, Marcote MJ, Hirt H, Colcombet J (2015) Identification and characterization of an ABA-activated MAP kinase cascade in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 82 (2):232-244. doi:10.1111/tpj.12808
- Dassanayake M, Larkin JC (2017) Making Plants Break a Sweat: the Structure, Function, and Evolution of Plant Salt Glands. *Frontiers in Plant Science* 8. doi:ARTN 406 10.3389/fpls.2017.00406
- Dassanayake M, Oh DH, Hong H, Bohnert HJ, Cheeseman JM (2011) Transcription strength and halophytic lifestyle. *Trends Plant Sci* 16 (1):1-3. doi:10.1016/j.tplants.2010.10.006
- Davenport RJ, Munoz-Mayor A, Jha D, Essah PA, Rus A, Tester M (2007) The Na⁺ transporter AtHKT1;1 controls retrieval of Na⁺ from the xylem in *Arabidopsis*. *Plant Cell Environ* 30 (4):497-507. doi:10.1111/j.1365-3040.2007.01637.x
- De Angeli A, Monachello D, Ephritikhine G, Frachisse JM, Thomine S, Gambale F, Barbier-Brygoo H (2006) The nitrate/proton antiporter AtCLCa mediates nitrate accumulation in plant vacuoles. *Nature* 442 (7105):939-942. doi:10.1038/nature05013
- Demidchik V, Tester M (2002) Sodium fluxes through nonselective cation channels in the plasma membrane of protoplasts from *Arabidopsis* roots. *Plant Physiol* 128 (2):379-387. doi:DOI 10.1104/pp.010524
- Di FF, Jian HJ, Wang TY, Chen XP, Ding YR, Du H, Lu K, Li JN, Liu LZ (2018) Genome-Wide Analysis of the PYL Gene Family and Identification of PYL Genes That Respond to Abiotic Stress in *Brassica napus*. *Genes-Basel* 9 (3). doi:ARTN 156 10.3390/genes9030156
- Djibril S, Mohamed OK, Diaga D, Diegane D, Abaye BF, Maurice S, Alain B (2005) Growth and development of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) seedlings under drought and salinity stresses. *Afr J Biotechnol* 4 (9):968-972
- Dreyer B, Morte A, Lopez JA, Honrubia M (2010) Comparative study of mycorrhizal susceptibility and anatomy of four palm species. *Mycorrhiza* 20 (2):103-115. doi:10.1007/s00572-009-0266-x
- Dreyer I, Antunes S, Hoshi T, MullerRober B, Palme K, Pongs O, Reintanz B, Hedrich R (1997) Plant K⁺ channel alpha-subunits assemble indiscriminately. *Biophys J* 72 (5):2143-2150
- EI-Juhany LI (2010) Degradation of Date Palm Trees and Date Production in Arab Countries: Causes and Potential Rehabilitation. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences* 4(8):3998-4010
- EI Rabey HA, Al-Malki AL, Abulhaja KO, Rohde W (2015) Proteome Analysis for Understanding Abiotic Stress (Salinity and Drought) Tolerance in Date Palm (*Phoenix dactylifera* L.). *Int J Genomics*. doi:Artn 407165 10.1155/2015/407165
- Engineer CB, Hashimoto-Sugimoto M, Negi J, Israelsson-Nordstrom M, Azoulay-Shemer T, Rappel WJ, Iba K, Schroeder JI (2016) CO₂ Sensing and CO₂ pecculation of Stomatal Conductance: Advances and Open Questions. *Trends Plant Sci* 21 (1):16-30. doi:10.1016/j.tplants.2015.08.014
- Epstein E, Elzam OE, Rains DW (1963) Resolution of Dual Mechanisms of Potassium Absorption by Barley Roots. *P Natl Acad Sci USA* 49 (5):684-&. doi:DOI 10.1073/pnas.49.5.684
- FAO (2017) THE STATE OF FOOD AND AGRICULTURE Leveraging food systems for inclusive rural transformation. Rome
- FAO (2011) The state of the world's land and water resources for food and agriculture (SOLAW) – Managing systems at risk. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome and Earthscan, London
- FAO, IFAD, UNICEF, WFP, WHO (2017) The State of Food Security and Nutrition in the World 2017. Building resilience for peace and food security. Rome

- Feki K, Quintero FJ, Pardo JM, Masmoudi K (2011) Regulation of durum wheat Na⁺/H⁺ exchanger TdSOS1 by phosphorylation. *Plant Mol Biol* 76 (6):545-556. doi:10.1007/s11103-011-9787-8
- Finkelstein R (2013) Abscisic Acid synthesis and response. *Arabidopsis Book* 11:e0166. doi:10.1199/tab.0166
- Flexas J, Bota J, Loreto F, Cornic G, Sharkey TD (2004) Diffusive and metabolic limitations to photosynthesis under drought and salinity in C(3) plants. *Plant Biology* 6 (3):269-279. doi:10.1055/s-2004-820867
- Flowers TJ, Galal HK, Bromham L (2010) Evolution of halophytes: multiple origins of salt tolerance in land plants. *Funct Plant Biol* 37 (7):604-612. doi:10.1071/Fp09269
- Flowers TJ, Munns R, Colmer TD (2015) Sodium chloride toxicity and the cellular basis of salt tolerance in halophytes. *Ann Bot-London* 115 (3):419-431. doi:10.1093/aob/mcu217
- Foley JA, DeFries R, Asner GP, Barford C, Bonan G, Carpenter SR, Chapin FS, Coe MT, Daily GC, Gibbs HK, Helkowski JH, Holloway T, Howard EA, Kucharik CJ, Monfreda C, Patz JA, Prentice IC, Ramankutty N, Snyder PK (2005) Global consequences of land use. *Science* 309 (5734):570-574. doi:10.1126/science.1111772
- Foley JA, Ramankutty N, Brauman KA, Cassidy ES, Gerber JS, Johnston M, Mueller ND, O'Connell C, Ray DK, West PC, Balzer C, Bennett EM, Carpenter SR, Hill J, Monfreda C, Polasky S, Rockstrom J, Sheehan J, Siebert S, Tilman D, Zaks DP (2011) Solutions for a cultivated planet. *Nature* 478 (7369):337-342. doi:10.1038/nature10452
- Franco-Navarro JD, Brumos J, Rosales MA, Cubero-Font P, Talon M, Colmenero-Flores JM (2016) Chloride regulates leaf cell size and water relations in tobacco plants. *J Exp Bot* 67 (3):873-891. doi:10.1093/jxb/erv502
- Franks PJ, Farquhar GD (2007) The mechanical diversity of stomata and its significance in gas-exchange control. *Plant Physiol* 143 (1):78-87. doi:10.1104/pp.106.089367
- Frey A, Effroy D, Lefebvre V, Seo M, Perreau F, Berger A, Sechet J, To A, North HM, Marion-Poll A (2012) Epoxy-carotenoid cleavage by NCED5 fine-tunes ABA accumulation and affects seed dormancy and drought tolerance with other NCED family members. *Plant J* 70 (3):501-512. doi:10.1111/j.1365-3113.2011.04887.x
- Fuentes-Bazan S, Uotila P, Borsch T (2012) A novel phylogeny-based generic classification for *Chenopodium sensu lato*, and a tribal rearrangement of *Chenopodioideae* (*Chenopodiaceae*). *Willdenowia* 42 (1):5-24. doi:10.3372/wi.42.42101
- Fuentes FF, Martinez EA, Hinrichsen PV, Jellen EN, Maughan PJ (2009) Assessment of genetic diversity patterns in Chilean quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) germplasm using multiplex fluorescent microsatellite markers. *Conserv Genet* 10 (2):369-377. doi:10.1007/s10592-008-9604-3
- Fujii H, Chinnusamy V, Rodrigues A, Rubio S, Antoni R, Park SY, Cutler SR, Sheen J, Rodriguez PL, Zhu JK (2009) In vitro reconstitution of an abscisic acid signalling pathway. *Nature* 462 (7273):660-U138. doi:10.1038/nature08599
- Furumoto T, Yamaguchi T, Ohshima-Ichie Y, Nakamura M, Tsuchida-Iwata Y, Shimamura M, Ohnishi J, Hata S, Gowik U, Westhoff P, Brautigam A, Weber APM, Izui K (2011) A plastidial sodium-dependent pyruvate transporter (vol 476, pg 472, 2011). *Nature* 478 (7368):274-274. doi:10.1038/nature10518
- Gagneul D, Ainouche A, Duhaze C, Lugin R, Larher FR, Bouchereau A (2007) A reassessment of the function of the so-called compatible solutes in the halophytic *Plumbaginaceae* *Limonium latifolium*. *Plant Physiol* 144 (3):1598-1611. doi:10.1104/pp.107.099820
- Galmes J, Aranjuelo I, Medrano H, Flexas J (2013) Variation in Rubisco content and activity under variable climatic factors. *Photosynth Res* 117 (1-3):73-90. doi:10.1007/s11120-013-9861-y
- Garthwaite AJ, von Bothmer R, Colmer TD (2005) Salt tolerance in wild *Hordeum* species is associated with restricted entry of Na⁺ and Cl⁻ into the shoots. *J Exp Bot* 56 (419):2365-2378. doi:10.1093/jxb/eri229

- Geiger D, Maierhofer T, AL-Rasheid KAS, Scherzer S, Mumm P, Liese A, Ache P, Wellmann C, Marten I, Grill E, Romeis T, Hedrich R (2011) Stomatal Closure by Fast Abscisic Acid Signaling Is Mediated by the Guard Cell Anion Channel SLAH3 and the Receptor RCAR1. *Sci Signal* 4 (173). doi:ARTN ra32
10.1126/scisignal.2001346
- Geiger D, Scherzer S, Mumm P, Marten I, Ache P, Matschi S, Liese A, Wellmann C, Al-Rasheid KAS, Grill E, Romeis T, Hedrich R (2010) Guard cell anion channel SLAC1 is regulated by CDPK protein kinases with distinct Ca²⁺ affinities. *P Natl Acad Sci USA* 107 (17):8023-8028. doi:10.1073/pnas.0912030107
- Geiger D, Scherzer S, Mumm P, Stange A, Marten I, Bauer H, Ache P, Matschi S, Liese A, Al-Rasheid KA, Romeis T, Hedrich R (2009) Activity of guard cell anion channel SLAC1 is controlled by drought-stress signaling kinase-phosphatase pair. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106 (50):21425-21430. doi:10.1073/pnas.0912021106
- Geissler N, Hussin S, Koyro HW (2009) Interactive effects of NaCl salinity and elevated atmospheric CO₂ concentration on growth, photosynthesis, water relations and chemical composition of the potential cash crop halophyte *Aster tripolium* L. *Environ Exp Bot* 65 (2-3):220-231. doi:10.1016/j.envexpbot.2008.11.001
- Geissler N, Lieth H, Koyro H-W (2014) Cash Crop Halophytes: The Ecologically and Economically Sustainable Use of Naturally Salt-Resistant Plants in the Context of Global Changes. In: Ahmad P, Wani MR (eds) *Physiological Mechanisms and Adaptation Strategies in Plants Under Changing Environment: Volume 1*. Springer New York, New York, NY, pp 145-162. doi:10.1007/978-1-4614-8591-9_7
- Gierth M, Maser P, Schroeder JI (2005) The potassium transporter AtHAK5 functions in K⁺ deprivation-induced high-affinity K⁺ uptake and AKT1 K⁺ channel contribution to K⁺ uptake kinetics in *Arabidopsis* roots. *Plant Physiol* 137 (3):1105-1114. doi:10.1104/pp.104.057216
- Gilroy S, Jones DL (2000) Through form to function: root hair development and nutrient uptake. *Trends Plant Sci* 5 (2):56-60. doi:Doi 10.1016/S1360-1385(99)01551-4
- Giulietti A, Overbergh L, Valckx D, Decallonne B, Bouillon R, Mathieu C (2001) An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. *Methods* 25 (4):386-401. doi:10.1006/meth.2001.1261
- Glover BJ (2000) Differentiation in plant epidermal cells. *J Exp Bot* 51 (344):497-505. doi:DOI 10.1093/jexbot/51.344.497
- Godfray HC, Beddington JR, Crute IR, Haddad L, Lawrence D, Muir JF, Pretty J, Robinson S, Thomas SM, Toulmin C (2010) Food security: the challenge of feeding 9 billion people. *Science* 327 (5967):812-818. doi:10.1126/science.1185383
- Godfray HC, Garnett T (2014) Food security and sustainable intensification. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 369 (1639):20120273. doi:10.1098/rstb.2012.0273
- Golldack D, Quigley F, Michalowski CB, Kamasani UR, Bohnert HJ (2003) Salinity stress-tolerant and -sensitive rice (*Oryza sativa* L.) regulate AKT1-type potassium channel transcripts differently. *Plant Mol Biol* 51 (1):71-81. doi:Doi 10.1023/A:1020763218045
- Gong QQ, Li PH, Ma SS, Rupassara SI, Bohnert HJ (2005) Salinity stress adaptation competence in the extremophile *Thellungiella halophila* in comparison with its relative *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 44 (5):826-839. doi:10.1111/j.1365-313X.2005.02587.x
- Gonzalez-Guzman M, Pizzio GA, Antoni R, Vera-Sirera F, Merilo E, Bassel GW, Fernandez MA, Holdsworth MJ, Perez-Amador MA, Kollist H, Rodriguez PL (2012) *Arabidopsis* PYR/PYL/RCAR Receptors Play a Major Role in Quantitative Regulation of Stomatal Aperture and Transcriptional Response to Abscisic Acid. *Plant Cell* 24 (6):2483-2496. doi:10.1105/tpc.112.098574
- Grallath S, Weimar T, Meyer A, Gummy C, Suter-Grotemeyer M, Neuhaus JM, Rentsch D (2005) The AtProT family. Compatible solute transporters with similar substrate specificity but differential expression patterns. *Plant Physiol* 137 (1):117-126. doi:10.1104/pp.104.055079

- Greenway H, Osmond CB (1972) Salt Responses of Enzymes from Species Differing in Salt Tolerance. *Plant Physiol* 49 (2):256-&. doi:DOI 10.1104/pp.49.2.256
- Haj-Amor Z, Toth T, Ibrahim MK, Bouri S (2017) Effects of excessive irrigation of date palm on soil salinization, shallow groundwater properties, and water use in a Saharan oasis. *Environ Earth Sci* 76 (17). doi:ARTN 590
10.1007/s12665-017-6935-8
- Halfter U, Ishitani M, Zhu JK (2000) The Arabidopsis SOS2 protein kinase physically interacts with and is activated by the calcium-binding protein SOS3. *Proc Natl Acad Sci USA* 97 (7):3735-3740. doi:DOI 10.1073/pnas.040577697
- Han Y, Yin S, Huang L, Wu X, Zeng J, Liu X, Qiu L, Munns R, Chen ZH, Zhang G (2018) A Sodium Transporter HvHKT1;1 Confers Salt Tolerance in Barley via Regulating Tissue and Cell Ion Homeostasis. *Plant Cell Physiol*. doi:10.1093/pcp/pcy116
- Hao Q, Yin P, Li WQ, Wang L, Yan CY, Lin ZH, Wu JZ, Wang JW, Yan SF, Yan N (2011) The Molecular Basis of ABA-Independent Inhibition of PP2Cs by a Subclass of PYL Proteins. *Mol Cell* 42 (5):662-672. doi:10.1016/j.molcel.2011.05.011
- Hare PD, Cress WA (1997) Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants. *Plant Growth Regul* 21 (2):79-102. doi:Doi 10.1023/A:1005703923347
- Hariadi Y, Marandon K, Tian Y, Jacobsen SE, Shabala S (2011) Ionic and osmotic relations in quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) plants grown at various salinity levels. *J Exp Bot* 62 (1):185-193. doi:10.1093/jxb/erq257
- Haruta M, Burch HL, Nelson RB, Barrett-Wilt G, Kline KG, Mohsin SB, Young JC, Otegui MS, Sussman MR (2010) Molecular Characterization of Mutant Arabidopsis Plants with Reduced Plasma Membrane Proton Pump Activity. *J Biol Chem* 285 (23):17918-17929. doi:10.1074/jbc.M110.101733
- Hasanuzzaman M, Davies NW, Shabala L, Zhou MX, Brodribb TJ, Shabala S (2017) Residual transpiration as a component of salinity stress tolerance mechanism: a case study for barley. *Bmc Plant Biol* 17. doi:ARTN 107
10.1186/s12870-017-1054-y
- Hashimoto M, Negi J, Young J, Israelsson M, Schroeder JI, Iba K (2006) Arabidopsis HT1 kinase controls stomatal movements in response to CO₂. *Nat Cell Biol* 8 (4):391-U352. doi:10.1038/ncb1387
- Hassan M, Gadalla E, Abd-El Kareim A (2008) Effect of sucrose and abscisic acid on in vitro growth and development of date palm during rooting stage.
- Hauser F, Waadt R, Schroeder JI (2011) Evolution of abscisic acid synthesis and signaling mechanisms. *Curr Biol* 21 (9):R346-355. doi:10.1016/j.cub.2011.03.015
- He Y, Hao Q, Li WQ, Yan CY, Yan N, Yin P (2014) Identification and Characterization of ABA Receptors in *Oryza sativa*. *Plos One* 9 (4). doi:ARTN e95246
10.1371/journal.pone.0095246
- Hedrich R, Geiger D (2017) Biology of SLAC1-type anion channels - from nutrient uptake to stomatal closure. *New Phytol* 216 (1):46-61. doi:10.1111/nph.14685
- Hedrich R, Shabala S (2018) Stomata in a saline world. *Curr Opin Plant Biol* 46:87-95. doi:https://doi.org/10.1016/j.pbi.2018.07.015
- Henderson SW, Baumann U, Blackmore DH, Walker AR, Walker RR, Gilliam M (2014) Shoot chloride exclusion and salt tolerance in grapevine is associated with differential ion transporter expression in roots. *Bmc Plant Biol* 14. doi:ARTN 273
10.1186/s12870-014-0273-8
- Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R (1992) Simultaneous Amplification and Detection of Specific DNA Sequences. *Bio/Technology* 10:413. doi:10.1038/nbt0492-413
- Hille B (2001) Ion channels of excitable membranes, vol 507. Sinauer Sunderland, MA,
- Hirner A, Ladwig F, Stransky H, Okumoto S, Keinath M, Harms A, Frommer WB, Koch W (2006) Arabidopsis LHT1 is a high-affinity transporter for cellular amino acid uptake in both root epidermis and leaf mesophyll. *Plant Cell* 18 (8):1931-1946. doi:10.1105/tpc.106.041012

- Hirsch RE, Lewis BD, Spalding EP, Sussman MR (1998) A role for the AKT1 potassium channel in plant nutrition. *Science* 280 (5365):918-921. doi:DOI 10.1126/science.280.5365.918
- Holmgren P, Jarvis PG, Jarvis MS (1965) Resistance to Carbon Dioxide and Water Vapor Transfer in Leaves of Different Plant Species. *Physiologia Plantarum* 18:557-573
- Hsiao TC (1973) Plant Responses to Water Stress. *Annu Rev Plant Phys* 24:519-570. doi:DOI 10.1146/annurev.pp.24.060173.002511
- Hsu PK, Takahashi Y, Munemasa S, Merilo E, Laanemets K, Waadt R, Pater D, Kollist H, Schroeder JI (2018) Abscisic acid-independent stomatal CO₂ signal transduction pathway and convergence of CO₂ and ABA signaling downstream of OST1 kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. doi:10.1073/pnas.1809204115
- Hu HH, Boisson-Dernier A, Israelsson-Nordstrom M, Bohmer M, Xue SW, Ries A, Godoski J, Kuhn JM, Schroeder JI (2010) Carbonic anhydrases are upstream regulators of CO₂-controlled stomatal movements in guard cells. *Nat Cell Biol* 12 (1):87-U234. doi:10.1038/ncb2009
- Hu YC, Schmidhalter U (2005) Drought and salinity: A comparison of their effects on mineral nutrition of plants. *J Plant Nutr Soil Sc* 168 (4):541-549. doi:10.1002/jpln.200420516
- Huang DQ, Wu WR, Abrams SR, Cutler AJ (2008) The relationship of drought-related gene expression in *Arabidopsis thaliana* to hormonal and environmental factors. *J Exp Bot* 59 (11):2991-3007. doi:10.1093/jxb/ern155
- Hunt J (1982) Dilute hydrochloric acid extraction of plant material for routine cation analysis. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 13 (1):49-55. doi:10.1080/00103628209367243
- Hunt S (2003) Measurements of photosynthesis and respiration in plants *Physiologia Plantarum* Volume 117, Issue 3. *Physiologia Plantarum* 117 (3):314-325
- Imes D, Mumm P, Bohm J, Al-Rasheid KAS, Marten I, Geiger D, Hedrich R (2013) Open stomata 1 (OST1) kinase controls R-type anion channel QUAC1 in *Arabidopsis* guard cells. *Plant J* 74 (3):372-382. doi:10.1111/tj.12133
- Inoue S, Kinoshita T (2017) Blue Light Regulation of Stomatal Opening and the Plasma Membrane H⁺-ATPase. *Plant Physiol* 174 (2):531-538. doi:10.1104/pp.17.00166
- IPCC (2014) *Climate Change 2014: Synthesis Report*. Geneva
- Irigoyen ML, Iniesto E, Rodriguez L, Puga MI, Yanagawa Y, Pick E, Strickland E, Paz-Ares J, Wei N, De Jaeger G, Rodriguez PL, Deng XW, Rubio V (2014) Targeted Degradation of Abscisic Acid Receptors Is Mediated by the Ubiquitin Ligase Substrate Adaptor DDA1 in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 26 (2):712-728. doi:10.1105/tpc.113.122234
- Ivashikina N, Becker D, Ache P, Meyerhoff O, Felle HH, Hedrich R (2001) K⁺ channel profile and electrical properties of *Arabidopsis* root hairs. *Febs Lett* 508 (3):463-469. doi:doi:10.1016/S0014-5793(01)03114-3
- Jacobsen SE (2003) The worldwide potential for quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). *Food Rev Int* 19 (1-2):167-177. doi:10.1081/Fri-120018883
- Janson M (2018) Ernteauffälle 2018 erreichen dramatisches Ausmaß. *Statista Infografiken*. <https://de.statista.com/infografik/14990/ernteausfaelle-in-deutschland/><https://de.statista.com/infografik/14990/ernteausfaelle-in-deutschland/>. Accessed Oktober 8, 2018
- Jarvis DE, Ho YS, Lightfoot DJ, Schmockel SM, Li B, Borm TJA, Ohyanagi H, Mineta K, Michell CT, Saber N, Kharbatia NM, Rupper RR, Sharp AR, Dally N, Boughton BA, Woo YH, Gao G, Schijlen EGWM, Guo XJ, Momin AA, Negrao S, Al-Babili S, Gehring C, Roessner U, Jung C, Murphy K, Arold ST, Gojobori T, van der Linden CG, van Loo EN, Jellen EN, Maughan PJ, Tester M (2017) The genome of *Chenopodium quinoa*. *Nature* 542 (7641):307-+. doi:10.1038/nature21370
- Jellen EN, J. MP, Fuentes F, Kolano BA (2015) Botany, Phylogeny and Evolution. In: D. Bazile DB, C. Nieto (ed) *State of the Art Report of Quinoa in the World in 2013*. Rome, pp 12-23

- Jiang X, Leidi EO, Pardo JM (2010) How do vacuolar NHX exchangers function in plant salt tolerance? *Plant Signal Behav* 5 (7):792-795
- Jossier M, Kroniewicz L, Dalmás F, Le Thiec D, Ephritikhine G, Thomine S, Barbier-Brygoo H, Vavasseur A, Filleur S, Leonhardt N (2010) The Arabidopsis vacuolar anion transporter, AtCLCc, is involved in the regulation of stomatal movements and contributes to salt tolerance. *Plant J* 64 (4):563-576. doi:10.1111/j.1365-313X.2010.04352.x
- Kant S, Kant P, Raveh E, Barak S (2006) Evidence that differential gene expression between the halophyte, *Thellungiella halophila*, and *Arabidopsis thaliana* is responsible for higher levels of the compatible osmolyte proline and tight control of Na⁺ uptake in *T. halophila*. *Plant Cell Environ* 29 (7):1220-1234. doi:10.1111/j.1365-3040.2006.01502.x
- Kiani-Pouya A, Roessner U, Jayasinghe NS, Lutz A, Rupasinghe T, Bazihizina N, Böhm J, Alharbi S, Hedrich R, Shabala S (2017) Epidermal bladder cells confer salinity stress tolerance in the halophyte quinoa and *Atriplex* species. *Plant Cell Environ* 40 (9):1900-1915. doi:10.1111/pce.12995
- Kishor PBK, Sreenivasulu N (2014) Is proline accumulation per se correlated with stress tolerance or is proline homeostasis a more critical issue? *Plant Cell Environ* 37 (2):300-311. doi:10.1111/pce.12157
- Kiyosue T, Yoshida Y, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (1996) A nuclear gene encoding mitochondrial proline dehydrogenase, an enzyme involved in proline metabolism, is upregulated by proline but downregulated by dehydration in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 8 (8):1323-1335. doi:DOI 10.1105/tpc.8.8.1323
- Kollist H, Nuhkat M, Roelfsema MRG (2014) Closing gaps: linking elements that control stomatal movement. *New Phytol* 203 (1):44-62. doi:10.1111/nph.12832
- Kong LY, Cheng JK, Zhu YJ, Ding YL, Meng JJ, Chen ZZ, Xie Q, Guo Y, Li JG, Yang SH, Gong ZZ (2015) Degradation of the ABA co-receptor ABI1 by PUB12/13 U-box E3 ligases. *Nat Commun* 6. doi:ARTN 8630
10.1038/ncomms9630
- Koyro H-W, Stelzer R (1988) Ion Concentrations in the Cytoplasm and Vacuoles of Rhizodermis Cells from NaCl treated Sorghum, *Spartina* and *Puccinellia* Plants. *J Plant Physiol* 133 (4):441-446. doi:https://doi.org/10.1016/S0176-1617(88)80033-6
- Kronzucker HJ, Coskun D, Schulze LM, Wong JR, Britto DT (2013) Sodium as nutrient and toxicant. *Plant Soil* 369 (1-2):1-23. doi:10.1007/s11104-013-1801-2
- Kugler A, Köhler B, Palme K, Wolff P, Dietrich P (2009) Salt-dependent regulation of a CNG channel subfamily in *Arabidopsis*. *Bmc Plant Biol* 9. doi:Artn 140
10.1186/1471-2229-9-140
- Kumari A, Das P, Parida AK, Agarwal PK (2015) Proteomics, metabolomics, and ionomics perspectives of salinity tolerance in halophytes. *Frontiers in Plant Science* 6. doi:ARTN 537
10.3389/fpls.2015.00537
- Lagarde D, Basset M, Lepetit M, Conejero G, Gaymard F, Astruc S, Grignon C (1996) Tissue-specific expression of arabidopsis AKT1 gene is consistent with a role in K⁺ nutrition. *Plant J* 9 (2):195-203. doi:DOI 10.1046/j.1365-313X.1996.09020195.x
- Lambers H, Chapin FS, Pons TL (2008) *Plant Physiological Ecology*. Springer New York,
- Lange OL (1959) Untersuchungen über Wärmehaushalt und Hitzeresistenz mauretanischer Wüsten- und Savannenpflanzen. *Flora oder Allgemeine Botanische Zeitung* 147 (4):595-651. doi:https://doi.org/10.1016/S0367-1615(17)31984-5
- Laurell H, Iacovoni JS, Abot A, Svec D, Maoret JJ, Arnal JF, Kubista M (2012) Correction of RT-qPCR data for genomic DNA-derived signals with ValidPrime. *Nucleic Acids Res* 40 (7):e51. doi:10.1093/nar/gkr1259
- Lebaudy A, Hosy E, Simonneau T, Sentenac H, Thibaud JB, Dreyer I (2008) Heteromeric K⁺ channels in plants. *Plant J* 54 (6):1076-1082. doi:10.1111/j.1365-313X.2008.03479.x

- Lee KH, Piao HL, Kim HY, Choi SM, Jiang F, Hartung W, Hwang I, Kwak JM, Lee IJ, Hwang I (2006) Activation of glucosidase via stress-induced polymerization rapidly increases active pools of abscisic acid. *Cell* 126 (6):1109-1120. doi:10.1016/j.cell.2006.07.034
- Lee Y, Kim YJ, Kim MH, Kwak JM (2016) MAPK Cascades in Guard Cell Signal Transduction. *Frontiers in Plant Science* 7. doi:ARTN 10.3389/fpls.2016.00080
- Lehmann S, Funck D, Szabados L, Rentsch D (2010) Proline metabolism and transport in plant development. *Amino Acids* 39 (4):949-962. doi:10.1007/s00726-010-0525-3
- Leigh RA, Jones RGW (1984) A Hypothesis Relating Critical Potassium Concentrations for Growth to the Distribution and Functions of This Ion in the Plant-Cell. *New Phytol* 97 (1):1-13. doi:DOI 10.1111/j.1469-8137.1984.tb04103.x
- Leng Q, Mercier RW, Hua BG, Fromm H, Berkowitz GA (2002) Electrophysiological analysis of cloned cyclic nucleotide-gated ion channels. *Plant Physiol* 128 (2):400-410. doi:DOI 10.1104/pp.010832
- Leon-Kloosterziel KM, Gil MA, Ruijs GJ, Jacobsen SE, Olszewski NE, Schwartz SH, Zeevaart JA, Koornneef M (1996) Isolation and characterization of abscisic acid-deficient *Arabidopsis* mutants at two new loci. *Plant J* 10 (4):655-661
- Leran S, Varala K, Boyer JC, Chiurazzi M, Crawford N, Daniel-Vedele F, David L, Dickstein R, Fernandez E, Forde B, Gassmann W, Geiger D, Gojon A, Gong JM, Halkier BA, Harris JM, Hedrich R, Limami AM, Rentsch D, Seo M, Tsay YF, Zhang MY, Coruzzi G, Lacombe B (2014) A unified nomenclature of NITRATE TRANSPORTER 1/PEPTIDE TRANSPORTER family members in plants. *Trends Plant Sci* 19 (1):5-9. doi:10.1016/j.tplants.2013.08.008
- Li B, Byrt C, Qiu J, Baumann U, Hrmova M, Evrard A, Johnson AAT, Birnbaum KD, Mayo GM, Jha D, Henderson SW, Tester M, Gilliam M, Roy SJ (2016) Identification of a Stelar-Localized Transport Protein That Facilitates Root-to-Shoot Transfer of Chloride in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 170 (2):1014-1029. doi:10.1104/pp.15.01163
- Li B, Tester M, Gilliam M (2017) Chloride on the move. *Trends Plant Sci* 22 (3):236-248. doi:10.1016/j.tplants.2016.12.004
- Li DK, Li Y, Zhang L, Wang XY, Zhao Z, Tao ZW, Wang JM, Wang J, Lin M, Li XF, Yang Y (2014) *Arabidopsis* ABA Receptor RCAR1/PYL9 Interacts with an R2R3-Type MYB Transcription Factor, AtMYB44. *Int J Mol Sci* 15 (5):8473-8490. doi:10.3390/ijms15058473
- Li Y, Peng LR, Xie CY, Shi XQ, Dong CX, Shen QR, Xu YC (2018) Genome-wide identification, characterization, and expression analyses of the HAK/KUP/KT potassium transporter gene family reveals their involvement in K⁺ deficient and abiotic stress responses in pear rootstock seedlings. *Plant Growth Regul* 85 (2):187-198. doi:10.1007/s10725-018-0382-8
- Lind C, Dreyer I, Lopez-Sanjurjo EJ, von Meyer K, Ishizaki K, Kohchi T, Lang D, Zhao Y, Kreuzer I, Al-Rasheid KAS, Ronne H, Reski R, Zhu JK, Geiger D, Hedrich R (2015) Stomatal Guard Cells Co-opted an Ancient ABA-Dependent Desiccation Survival System to Regulate Stomatal Closure. *Curr Biol* 25 (7):928-935. doi:10.1016/j.cub.2015.01.067
- Lv QD, Tang RJ, Liu H, Gao XS, Li YZ, Zheng HQ, Zhang HX (2009) Cloning and molecular analyses of the *Arabidopsis thaliana* chloride channel gene family. *Plant Sci* 176 (5):650-661. doi:10.1016/j.plantsci.2009.02.006
- Ma Y, Szostkiewicz I, Korte A, Moes D, Yang Y, Christmann A, Grill E (2009) Regulators of PP2C Phosphatase Activity Function as Abscisic Acid Sensors. *Science* 324 (5930):1064-1068. doi:10.1126/science.1172408
- Maathuis FJM, Amtmann A (1999) K⁺ nutrition and Na⁺ toxicity: The basis of cellular K⁺/Na⁺ ratios. *Ann Bot-London* 84 (2):123-133. doi:DOI 10.1006/anbo.1999.0912
- MacIntyre I (1961) FLAME PHOTOMETRY. *Advances in Clinical Chemistry* 4

- Malcheska F, Ahmad A, Batool S, Muller HM, Ludwig-Muller J, Kreuzwieser J, Randewig D, Hansch R, Mendel RR, Hell R, Wirtz M, Geiger D, Ache P, Hedrich R, Herschbach C, Rennenberg H (2017) Drought-Enhanced Xylem Sap Sulfate Closes Stomata by Affecting ALMT12 and Guard Cell ABA Synthesis. *Plant Physiol* 174 (2):798-814. doi:10.1104/pp.16.01784
- Males J (2017) Secrets of succulence. *J Exp Bot* 68 (9):2121-2134. doi:10.1093/jxb/erx096
- Mansour MMF, Ali EF (2017) Evaluation of proline functions in saline conditions. *Phytochemistry* 140:52-68. doi:10.1016/j.phytochem.2017.04.016
- Marschner H, Marschner P (2011) *Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants*. third edition edn. Elsevier Science,
- Marten I, Deeken R, Hedrich R, Roelfsema MRG (2010) Light-induced modification of plant plasma membrane ion transport. *Plant Biology* 12:64-79. doi:10.1111/j.1438-8677.2010.00384.x
- Martins R, Queiroz JA, Sousa F (2014) Ribonucleic acid purification. *J Chromatogr A* 1355:1-14. doi:10.1016/j.chroma.2014.05.075
- Maxwell K, Johnson GN (2000) Chlorophyll fluorescence—a practical guide. *J Exp Bot* 51 (345):659-668. doi:10.1093/jexbot/51.345.659
- Melcher K, Ng LM, Zhou XE, Soon FF, Xu Y, Suino-Powell KM, Park SY, Weiner JJ, Fujii H, Chinnusamy V, Kovach A, Li J, Wang YH, Li JY, Peterson FC, Jensen DR, Yong EL, Volkman BF, Cutler SR, Zhu JK, Xu HE (2009) A gate-latch-lock mechanism for hormone signalling by abscisic acid receptors. *Nature* 462 (7273):602-U672. doi:10.1038/nature08613
- Merilo E, Joesaar I, Brosche M, Kollist H (2014) To open or to close: species-specific stomatal responses to simultaneously applied opposing environmental factors. *New Phytol* 202 (2):499-508. doi:10.1111/nph.12667
- Merilo E, Laanemets K, Hu HH, Xue SW, Jakobson L, Tulva I, Gonzalez-Guzman M, Rodriguez PL, Schroeder JI, Brosche M, Kollist H (2013) PYR/RCAR Receptors Contribute to Ozone-, Reduced Air Humidity-, Darkness-, and CO₂-Induced Stomatal Regulation. *Plant Physiol* 162 (3):1652-1668. doi:10.1104/pp.113.220608
- Monneveux P, Belhassen E (1997) The diversity of drought adaptation in the wide. In: Belhassen E (ed) *Drought Tolerance in Higher Plants: Genetical, Physiological and Molecular Biological Analysis*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp 7-14. doi:10.1007/978-94-017-1299-6_2
- Mott KA (2009) Opinion: Stomatal responses to light and CO₂ depend on the mesophyll. *Plant Cell Environ* 32 (11):1479-1486. doi:10.1111/j.1365-3040.2009.02022.x
- Müller HM, Schäfer N, Bauer H, Geiger D, Lautner S, Fromm J, Riederer M, Bueno A, Nussbaumer T, Mayer K, Alquraishi SA, Alfarhan AH, Neher E, Al-Rasheid KAS, Ache P, Hedrich R (2017) The desert plant *Phoenix dactylifera* closes stomata via nitrate-regulated SLAC1 anion channel. *New Phytol* 216 (1):150-162. doi:10.1111/nph.14672
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* 51 Pt 1:263-273
- Munemasa S, Hauser F, Park J, Waadt R, Brandt B, Schroeder JI (2015) Mechanisms of abscisic acid-mediated control of stomata! aperture. *Curr Opin Plant Biol* 28:154-162. doi:10.1016/j.pbi.2015.10.010
- Munné-Bosch S, Queval G, Foyer CH (2013) The Impact of Global Change Factors on Redox Signaling Underpinning Stress Tolerance. *Plant Physiol* 161 (1):5-19. doi:10.1104/pp.112.205690
- Munns R (1988) Why Measure Osmotic Adjustment. *Aust J Plant Physiol* 15 (6):717-726. doi:10.1071/Pp9880717
- Munns R (2002) Comparative physiology of salt and water stress. *Plant Cell Environ* 25 (2):239-250

- Munns R, James RA, Xu B, Athman A, Conn SJ, Jordans C, Byrt CS, Hare RA, Tyerman SD, Tester M, Plett D, Gilliam M (2012) Wheat grain yield on saline soils is improved by an ancestral Na⁺ transporter gene. *Nat Biotechnol* 30 (4):360-U173. doi:10.1038/nbt.2120
- Munns R, Tester M (2008) Mechanisms of salinity tolerance. *Annu Rev Plant Biol* 59:651-681. doi:10.1146/annurev.arplant.59.032607.092911
- Munns R, Wallace PA, Teakle NL, Colmer TD (2010) Measuring soluble ion concentrations (Na(+), K(+), Cl(-)) in salt-treated plants. *Methods Mol Biol* 639:371-382. doi:10.1007/978-1-60761-702-0_23
- Mustilli AC, Merlot S, Vavasseur A, Fenzi F, Giraudat J (2002) Arabidopsis OST1 protein kinase mediates the regulation of stomatal aperture by abscisic acid and acts upstream of reactive oxygen species production. *Plant Cell* 14 (12):3089-3099. doi:10.1105/tpc.007906
- Nakashima K, Satoh R, Kiyosue T, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (1998) A gene encoding proline dehydrogenase is not only induced by proline and hypoosmolarity, but is also developmentally regulated in the reproductive organs of Arabidopsis. *Plant Physiol* 118 (4):1233-1241. doi:DOI 10.1104/pp.118.4.1233
- Negi J, Matsuda O, Nagasawa T, Oba Y, Takahashi H, Kawai-Yamada M, Uchimiya H, Hashimoto M, Iba K (2008) CO₂ regulator SLAC1 and its homologues are essential for anion homeostasis in plant cells. *Nature* 452 (7186):483-486. doi:10.1038/nature06720
- Nguyen CT, Agorio A, Jossier M, Depre S, Thomine S, Filleur S (2016) Characterization of the Chloride Channel-Like, AtCLCg, Involved in Chloride Tolerance in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell Physiol* 57 (4):764-775. doi:10.1093/pcp/pcv169
- Nieves-Cordones M, Aleman F, Martinez V, Rubio F (2010) The Arabidopsis thaliana HAK5 K⁺ Transporter Is Required for Plant Growth and K⁺ Acquisition from Low K⁺ Solutions under Saline Conditions. *Mol Plant* 3 (2):326-333. doi:10.1093/mp/ssp102
- Nolan T, Hands RE, Bustin SA (2006) Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nat Protoc* 1 (3):1559-1582. doi:10.1038/nprot.2006.236
- Nonis A, Scortegagna M, Nonis A, Ruperti B (2011) PRaTo: a web-tool to select optimal primer pairs for qPCR. *Biochem Biophys Res Commun* 415 (4):707-708. doi:10.1016/j.bbrc.2011.10.148
- O'Brien JA, Vega A, Bouguyon E, Krouk G, Gojon A, Coruzzi G, Gutierrez RA (2016) Nitrate Transport, Sensing, and Responses in Plants. *Mol Plant* 9 (6):837-856. doi:10.1016/j.molp.2016.05.004
- Oh D-H, Qingqiu G, Alex U, Quan Z, Youzhi L, Wenying M, Dae-Jin Y, A. BR, J. BH (2007) Sodium Stress in the Halophyte *Thellungiella halophila* and Transcriptional Changes in a thsos1-RNA Interference Line. *Journal of Integrative Plant Biology* 49 (10):1484-1496. doi:doi:10.1111/j.1672-9072.2007.00548.x
- Oh DH, Barkla BJ, Vera-Estrella R, Pantoja O, Lee SY, Bohnert HJ, Dassanayake M (2015) Cell type-specific responses to salinity - the epidermal bladder cell transcriptome of *Mesembryanthemum crystallinum*. *New Phytol* 207 (3):627-644. doi:10.1111/nph.13414
- Oh DH, Dassanayake M, Haas JS, Kropornika A, Wright C, d'Urzo MP, Hong H, Ali S, Hernandez A, Lambert GM, Inan G, Galbraith DW, Bressan RA, Yun DJ, Zhu JK, Cheeseman JM, Bohnert HJ (2010) Genome Structures and Halophyte-Specific Gene Expression of the Extremophile *Thellungiella parvula* in Comparison with *Thellungiella salsuginea* (*Thellungiella halophila*) and Arabidopsis. *Plant Physiol* 154 (3):1040-1052. doi:10.1104/pp.110.163923
- Oh DH, Leidi E, Zhang Q, Hwang SM, Li YZ, Quintero FJ, Jiang XY, D'Urzo MP, Lee SY, Zhao YX, Bahk JD, Bressan RA, Yun DJ, Pardo JM, Bohnert HJ (2009) Loss of Halophytism by Interference with SOS1 Expression. *Plant Physiol* 151 (1):210-222. doi:10.1104/pp.109.137802

- Okumoto S, Schmidt R, Tegeder M, Fischer WN, Rentsch D, Frommer WB, Koch W (2002) High affinity amino acid transporters specifically expressed in xylem parenchyma and developing seeds of *Arabidopsis*. *J Biol Chem* 277 (47):45338-45346. doi:10.1074/jbc.M207730200
- Orsini F, Accorsi M, Gianquinto G, Dinelli G, Antognoni F, Carrasco KBR, Martinez EA, Alnayef M, Marotti I, Bosi S, Biondi S (2011) Beyond the ionic and osmotic response to salinity in *Chenopodium quinoa*: functional elements of successful halophytism. *Funct Plant Biol* 38 (10):818-831. doi:10.1071/Fp11088
- Orsini F, D'Urzo MP, Inan G, Serra S, Oh DH, Mickelbart MV, Consiglio F, Li X, Jeong JC, Yun DJ, Bohnert HJ, Bressan RA, Maggio A (2010) A comparative study of salt tolerance parameters in 11 wild relatives of *Arabidopsis thaliana*. *J Exp Bot* 61 (13):3787-3798. doi:10.1093/jxb/erq188
- Osmond CB, Lutttge U, West KR, Pallaghy CK, Shacherh.B (1969) Ion Absorption in *Atriplex* Leaf Tissue .2. Secretion of Ions to Epidermal Bladders. *Aust J Biol Sci* 22 (4):797-&. doi:Doi 10.1071/Bi9690797
- Pan YQ, Guo H, Wang SM, Zhao BY, Zhang JL, Ma Q, Yin HJ, Bao AK (2016) The Photosynthesis, Na⁺/K⁺ Homeostasis and Osmotic Adjustment of *Atriplex canescens* in Response to Salinity. *Frontiers in Plant Science* 7. doi:ARTN 848 10.3389/fpls.2016.00848
- Pandey S, Nelson DC, Assmann SM (2009) Two Novel GPCR-Type G Proteins Are Abscisic Acid Receptors in *Arabidopsis*. *Cell* 136 (1):136-148. doi:10.1016/j.cell.2008.12.026
- Pardo JM, Cubero B, Leidi EO, Quintero FJ (2006) Alkali cation exchangers: roles in cellular homeostasis and stress tolerance. *J Exp Bot* 57 (5):1181-1199. doi:10.1093/jxb/erj114
- Parida AK, Das AB (2005) Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. *Ecotox Environ Safe* 60 (3):324-349. doi:10.1016/j.ecoenv.2004.06.010
- Park E, Kim TH (2017) Production of ABA responses requires both the nuclear and cytoplasmic functional involvement of PYR1. *Biochem Bioph Res Co* 484 (1):34-39. doi:10.1016/j.bbrc.2017.01.082
- Park SY, Fung P, Nishimura N, Jensen DR, Fujii H, Zhao Y, Lumba S, Santiago J, Rodrigues A, Chow TFF, Alfred SE, Bonetta D, Finkelstein R, Provart NJ, Desveaux D, Rodriguez PL, McCourt P, Zhu JK, Schroeder JI, Volkman BF, Cutler SR (2009) Abscisic Acid Inhibits Type 2C Protein Phosphatases via the PYR/PYL Family of START Proteins. *Science* 324 (5930):1068-1071. doi:10.1126/science.1173041
- Peleg Z, Apse MP, Blumwald E (2011) Engineering Salinity and Water-Stress Tolerance in Crop Plants: Getting Closer to the Field. *Adv Bot Res* 57:405-443. doi:10.1016/B978-0-12-387692-8.00012-6
- Pfaffel MW (2004) Quantification strategies in real-time PCR. In: Bustin SA (ed) *A-Z of quantitative PCR*. pp 87-112
- Pizzio GA, Rodriguez L, Antoni R, Gonzalez-Guzman M, Yunta C, Merilo E, Kollist H, Albert A, Rodriguez PL (2013) The PYL4 A194T Mutant Uncovers a Key Role of PYR1-LIKE4/PROTEIN PHOSPHATASE 2CA Interaction for Abscisic Acid Signaling and Plant Drought Resistance. *Plant Physiol* 163 (1):441-455. doi:10.1104/pp.113.224162
- Platten JD, Cotsaftis O, Berthomieu P, Bohnert H, Davenport RJ, Fairbairn DJ, Horie T, Leigh RA, Lin HX, Luan S, Maser P, Pantoja O, Rodriguez-Navarro A, Schachtman DP, Schroeder JI, Sentenac H, Uozumi N, Very AA, Zhu JK, Dennis ES, Tester M (2006) Nomenclature for HKT transporters, key determinants of plant salinity tolerance. *Trends Plant Sci* 11 (8):372-374. doi:10.1016/j.tplants.2006.06.001
- Provart NJ, Alonso J, Assmann SM, Bergmann D, Brady SM, Brkljacic J, Browse J, Chapple C, Colot V, Cutler S, Dangl J, Ehrhardt D, Friesner JD, Frommer WB, Grotewold E, Meyerowitz E, Nemhauser J, Nordborg M, Pikaard C, Shanklin J, Somerville C, Stitt M, Torii KU, Waese J, Wagner D, McCourt P (2016) 50 years of *Arabidopsis* research: highlights and future directions. *New Phytol* 209 (3):921-944. doi:10.1111/nph.13687

- Qi GN, Yao FY, Ren HM, Sun SJ, Tan YQ, Zhang ZC, Qiu BS, Wang YF (2018) The S-Type Anion Channel ZmSLAC1 Plays Essential Roles in Stomatal Closure by Mediating Nitrate Efflux in Maize. *Plant Cell Physiol* 59 (3):614-623. doi:10.1093/pcp/pcy015
- Qi Z, Hampton CR, Shin R, Barkla BJ, White PJ, Schachtman DP (2008) The high affinity K⁺ transporter AtHAK5 plays a physiological role in planta at very low K⁺ concentrations and provides a caesium uptake pathway in Arabidopsis. *J Exp Bot* 59 (3):595-607. doi:10.1093/jxb/erm330
- Qiu JE, Henderson SW, Tester M, Roy SJ, Gilliam M (2016) SLAH1, a homologue of the slow type anion channel SLAC1, modulates shoot Cl⁻ accumulation and salt tolerance in Arabidopsis thaliana. *J Exp Bot* 67 (15):4495-4505. doi:10.1093/jxb/erw237
- Qiu L, Wu D, Ali S, Cai S, Dai F, Jin X, Wu F, Zhang G (2011) Evaluation of salinity tolerance and analysis of allelic function of HvHKT1 and HvHKT2 in Tibetan wild barley. *Theor Appl Genet* 122 (4):695-703. doi:10.1007/s00122-010-1479-2
- Qiu QS, Guo Y, Dietrich MA, Schumaker KS, Zhu JK (2002) Regulation of SOS1, a plasma membrane Na⁺/H⁺ exchanger in Arabidopsis thaliana, by SOS2 and SOS3. *P Natl Acad Sci USA* 99 (12):8436-8441. doi:10.1073/pnas.122224699
- Radwan O, Arro J, Keller C, Korban SS (2015) RNA-Seq Transcriptome Analysis in Date Palm Suggests Multi-Dimensional Responses to Salinity Stress. *Trop Plant Biol* 8 (3-4):74-86. doi:10.1007/s12042-015-9155-y
- Raghavendra AS, Gonugunta VK, Christmann A, Grill E (2010) ABA perception and signalling. *Trends Plant Sci* 15 (7):395-401. doi:10.1016/j.tplants.2010.04.006
- Ramesh SA, Tyerman SD, Xu B, Bose J, Kaur S, Conn V, Domingos P, Ullah S, Wege S, Shabala S, Feijó JA, Ryan PR, Gilliam M (2015) GABA signalling modulates plant growth by directly regulating the activity of plant-specific anion transporters. *Nat Commun* 6:7879. doi:10.1038/ncomms8879
- Ramoliya PJ, Pandey AN (2003) Soil salinity and water status affect growth of Phoenix dactylifera seedlings. *New Zeal J Crop Hort* 31 (4):345-353. doi:10.1080/01140671.2003.9514270
- Ramos J, López MJ, Benlloch M (2004) Effect of NaCl and KCl salts on the growth and solute accumulation of the halophyte Atriplex nummularia. *Plant Soil* 259 (1):163-168. doi:10.1023/B:PLSO.0000020953.50331.a5
- Raschke K (1975) Stomatal Action. *Annu Rev Plant Phys* 26:309-340. doi:10.1146/annurev.pp.26.060175.001521
- Raschke K, Fellows MP (1971) Stomatal Movement in Zea-Mays - Shuttle of Potassium and Chloride between Guard Cells and Subsidiary Cells. *Planta* 101 (4):296-&. doi:10.1007/Bf00398116
- Raschke K, Schnabl H (1978) Availability of Chloride Affects Balance between Potassium-Chloride and Potassium Malate in Guard Cells of Vicia-Faba L. *Plant Physiol* 62 (1):84-87. doi:10.1104/pp.62.1.84
- Reimann C, Breckle SW (1988) Anatomy and Development of Bladder Hairs in Chenopodium Species. *Flora* 180 (3-4):275-288
- Ren ZH, Gao JP, Li LG, Cai XL, Huang W, Chao DY, Zhu MZ, Wang ZY, Luan S, Lin HX (2005) A rice quantitative trait locus for salt tolerance encodes a sodium transporter. *Nat Genet* 37 (10):1141-1146. doi:10.1038/ng1643
- Rennenberg H, Loreto F, Polle A, Brilli F, Fares S, Beniwal RS, Gessler A (2006) Physiological responses of forest trees to heat and drought. *Plant Biology* 8 (5):556-571. doi:10.1055/s-2006-924084
- Richards LA (1954) Diagnosis and improvement of saline and alkali soils, vol 60. *Agricultural Handbook*. United States Department of Agriculture, Washington D. C. (USA)
- Riederer M (2007) Introduction: Biology of the Plant Cuticle. In: *Annual Plant Reviews Volume 23: Biology of the Plant Cuticle*. Blackwell Publishing Ltd, pp 1-10. doi:10.1002/9780470988718.ch1
- Riederer M, Schreiber L (2001) Protecting against water loss: analysis of the barrier properties of plant cuticles. *J Exp Bot* 52 (363):2023-2032. doi:10.1093/jexbot/52.363.2023

- Roelfsema MRG, Hanstein S, Felle HH, Hedrich R (2002) CO₂ provides an intermediate link in the red light response of guard cells. *Plant J* 32 (1):65-75. doi:DOI 10.1046/j.1365-313X.2002.01403.x
- Roelfsema MRG, Hedrich R (2005) In the light of stomatal opening: new insights into 'the Watergate'. *New Phytol* 167 (3):665-691. doi:10.1111/j.1469-8137.2005.01460.x
- Roelfsema MRG, Steinmeyer R, Staal M, Hedrich R (2001) Single guard cell recordings in intact plants: light-induced hyperpolarization of the plasma membrane. *Plant J* 26 (1):1-13. doi:DOI 10.1046/j.1365-313x.2001.01000.x
- Rozema J, Schat H (2013) Salt tolerance of halophytes, research questions reviewed in the perspective of saline agriculture. *Environ Exp Bot* 92:83-95. doi:10.1016/j.envexpbot.2012.08.004
- Rubio F, Aleman F, Nieves-Cordones M, Martinez V (2009a) Differential regulation of the genes encoding the high-affinity K⁺ transporters HAK5 of *Thellungiella halophila* and *Arabidopsis thaliana* in response to salinity. *Comp Biochem Phys A* 153a (2):S188-S188. doi:10.1016/j.cbpa.2009.04.415
- Rubio F, Santa-Maria GE, Rodriguez-Navarro A (2000) Cloning of *Arabidopsis* and barley cDNAs encoding HAK potassium transporters in root and shoot cells. *Physiol Plantarum* 109 (1):34-43. doi:DOI 10.1034/j.1399-3054.2000.100106.x
- Rubio S, Rodrigues A, Saez A, Dizon MB, Galle A, Kim TH, Santiago J, Flexas J, Schroeder JI, Rodriguez PL (2009b) Triple loss of function of protein phosphatases type 2C leads to partial constitutive response to endogenous abscisic acid. *Plant Physiol* 150 (3):1345-1355. doi:10.1104/pp.109.137174
- Rudall PJ, Chen ED, Cullen E (2017) Evolution and development of monocot stomata. *Am J Bot* 104 (8):1122-1141. doi:10.3732/ajb.1700086
- Ruffino AMC, Rosa M, Hilal M, Gonzalez JA, Prado FE (2010) The role of cotyledon metabolism in the establishment of quinoa (*Chenopodium quinoa*) seedlings growing under salinity. *Plant Soil* 326 (1-2):213-224. doi:10.1007/s11104-009-9999-8
- Ruiz-Carrasco K, Antognoni F, Coulibaly AK, Lizardi S, Covarrubias A, Martinez EA, Molina-Montenegro MA, Biondi S, Zurita-Silva A (2011) Variation in salinity tolerance of four lowland genotypes of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) as assessed by growth, physiological traits, and sodium transporter gene expression. *Plant Physiol Bioch* 49 (11):1333-1341. doi:10.1016/j.plaphy.2011.08.005
- Ruiz KB, Biondi S, Martinez EA, Orsini F, Antognoni F, Jacobsen SE (2016) Quinoa - a Model Crop for Understanding Salt-tolerance Mechanisms in Halophytes. *Plant Biosyst* 150 (2):357-371. doi:10.1080/11263504.2015.1027317
- Ruiz KB, Rapparini F, Bertazza G, Silva H, Torrigiani P, Biondi S (2017) Comparing salt-induced responses at the transcript level in a salares and coastal-lowlands landrace of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). *Environ Exp Bot* 139:127-142. doi:10.1016/j.envexpbot.2017.05.003
- Rus A, Lee BH, Munoz-Mayor A, Sharkhuu A, Miura K, Zhu JK, Bressan RA, Hasegawa PM (2004) AtHKT1 facilitates Na⁺ homeostasis and K⁺ nutrition in planta. *Plant Physiol* 136 (1):2500-2511. doi:10.1104/pp.104.042234
- Rus A, Yokoi S, Sharkhuu A, Reddy M, Lee BH, Matsumoto TK, Koiwa H, Zhu JK, Bressan RA, Hasegawa PM (2001) AtHKT1 is a salt tolerance determinant that controls Na⁺ entry into plant roots. *P Natl Acad Sci USA* 98 (24):14150-14155. doi:DOI 10.1073/pnas.241501798
- Rychlik W (2007) OLIGO 7 Primer Analysis Software. In: Yuryev A (ed) *PCR Primer Design*. Humana Press, Totowa, NJ, pp 35-59. doi:10.1007/978-1-59745-528-2_2
- Safronov O, Kreuzwieser J, Haberer G, Alyousif MS, Schulze W, Al-Harbi N, Arab L, Ache P, Stempf T, Kruse J, Mayer KX, Hedrich R, Rennenberg H, Salojarvi J, Kangasjarvi J (2017) Detecting early signs of heat and drought stress in *Phoenix dactylifera* (date palm). *Plos One* 12 (6). doi:ARTN e0177883
10.1371/journal.pone.0177883

- Sah SK, Reddy KR, Li JX (2016) Abscisic Acid and Abiotic Stress Tolerance in Crop Plants. *Frontiers in Plant Science* 7. doi:ARTN 571
10.3389/fpls.2016.00571
- Santiago J, Rodrigues A, Saez A, Rubio S, Antoni R, Dupeux F, Park SY, Marquez JA, Cutler SR, Rodriguez PL (2009) Modulation of drought resistance by the abscisic acid receptor PYL5 through inhibition of clade A PP2Cs. *Plant J* 60 (4):575-588. doi:10.1111/j.1365-313X.2009.03981.x
- Schäfer N, Maierhofer T, Herrmann J, Jorgensen ME, Lind C, von Meyer K, Lautner S, Fromm J, Felder M, Hetherington AM, Ache P, Geiger D, Hedrich R (2018) A Tandem Amino Acid Residue Motif in Guard Cell SLAC1 Anion Channel of Grasses Allows for the Control of Stomatal Aperture by Nitrate. *Curr Biol* 28 (9):1370-U1145. doi:10.1016/j.cub.2018.03.027
- Schmockel SM, Lightfoot DJ, Razali R, Tester M, Jarvis DE (2017) Identification of Putative Transmembrane Proteins Involved in Salinity Tolerance in *Chenopodium quinoa* by Integrating Physiological Data, RNAseq, and SNP Analyses. *Frontiers in Plant Science* 8. doi:ARTN 1023
10.3389/fpls.2017.01023
- Schuster A-C, Burghardt M, Alfathan A, Bueno A, Hedrich R, Leide J, Thomas J, Riederer M (2016) Effectiveness of cuticular transpiration barriers in a desert plant at controlling water loss at high temperatures. *AoB Plants* 8:plw027. doi:10.1093/aobpla/plw027
- Schwacke R, Grallath S, Breitzkreuz KE, Stransky E, Stransky H, Frommer WB, Rentsch D (1999) LeProT1, a transporter for proline, glycine betaine, and gamma-amino butyric acid in tomato pollen. *Plant Cell* 11 (3):377-392
- Schweighofer A, Hirt H, Meskiene L (2004) Plant PP2C phosphatases: emerging functions in stress signaling. *Trends Plant Sci* 9 (5):236-243. doi:10.1016/j.tplants.2004.03.007
- Shabala S (2013) Learning from halophytes: physiological basis and strategies to improve abiotic stress tolerance in crops. *Ann Bot-London* 112 (7):1209-1221. doi:10.1093/aob/mct205
- Shabala S, Bose J, Hedrich R (2014) Salt bladders: do they matter? *Trends Plant Sci* 19 (11):687-691. doi:10.1016/j.tplants.2014.09.001
- Shabala S, Cuin TA (2008) Potassium transport and plant salt tolerance. *Physiol Plantarum* 133 (4):651-669. doi:10.1111/j.1399-3054.2007.01008.x
- Shabala S, Pottosin I (2014) Regulation of potassium transport in plants under hostile conditions: implications for abiotic and biotic stress tolerance. *Physiol Plantarum* 151 (3):257-279. doi:10.1111/ppl.12165
- Shabani F, Kumar L, Taylor S (2012) Climate change impacts on the future distribution of date palms: a modeling exercise using CLIMEX. *Plos One* 7 (10):e48021. doi:10.1371/journal.pone.0048021
- Shen Y-Y, Wang X-F, Wu F-Q, Du S-Y, Cao Z, Shang Y, Wang X-L, Peng C-C, Yu X-C, Zhu S-Y, Fan R-C, Xu Y-H, Zhang D-P (2006) The Mg-chelatase H subunit is an abscisic acid receptor. *Nature* 443:823. doi:10.1038/nature05176
- Shi HZ, Ishitani M, Kim CS, Zhu JK (2000) The *Arabidopsis thaliana* salt tolerance gene *SOS1* encodes a putative Na⁺/H⁺ antiporter. *P Natl Acad Sci USA* 97 (12):6896-6901. doi:DOI 10.1073/pnas.120170197
- Shi HZ, Lee BH, Wu SJ, Zhu JK (2003) Overexpression of a plasma membrane Na⁺/H⁺ antiporter gene improves salt tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Nat Biotechnol* 21 (1):81-85. doi:10.1038/nbt766
- Shi HZ, Quintero FJ, Pardo JM, Zhu JK (2002) The putative plasma membrane Na⁺/H⁺ antiporter *SOS1* controls long-distance Na⁺ transport in plants. *Plant Cell* 14 (2):465-477. doi:10.1105/tpc.010371
- Shimazaki K, Doi M, Assmann SM, Kinoshita T (2007) Light regulation of stomatal movement. *Annu Rev Plant Biol* 58:219-247. doi:10.1146/annurev.arplant.57.032905.105434

- Sperling O, Lazarovitch N, Schwartz A, Shapira O (2014) Effects of high salinity irrigation on growth, gas-exchange, and photoprotection in date palms (*Phoenix dactylifera* L., cv. Medjool). *Environ Exp Bot* 99:100-109. doi:10.1016/j.envexpbot.2013.10.014
- Strizhov N, Abraham E, Okresz L, Blickling S, Zilberstein A, Schell J, Koncz C, Szabados L (1997) Differential expression of two P5CS genes controlling proline accumulation during salt-stress requires ABA and is regulated by ABA1, ABI1 and AXR2 in *Arabidopsis*. *Plant J* 12 (3):557-569. doi:DOI 10.1046/j.1365-313X.1997.00557.x
- Sturzenbaum SR (1999) Transfer RNA reduces the formation of primer artifacts during quantitative PCR. *Biotechniques* 27 (1):50-+
- Su H, Balderas E, Vera-Estrella R, Gollmack D, Quigley F, Zhao CS, Pantoja O, Bohnert JH (2003) Expression of the cation transporter McHKT1 in a halophyte. *Plant Mol Biol* 52 (5):967-980. doi:Doi 10.1023/A:1025445612244
- Su H, Gollmack D, Katsuhara M, Zhao CS, Bohnert HJ (2001) Expression and stress-dependent induction of potassium channel transcripts in the common ice plant. *Plant Physiol* 125 (2):604-614. doi:DOI 10.1104/pp.125.2.604
- Su H, Gollmack D, Zhao CS, Bohnert HJ (2002) The expression of HAK-type K⁺ transporters is regulated in response to salinity stress in common ice plant. *Plant Physiol* 129 (4):1482-1493. doi:10.1104/pp.001149
- Subbarao GV, Ito O, Berry WL, Wheeler RM (2003) Sodium - A functional plant nutrient. *Crit Rev Plant Sci* 22 (5):391-416. doi:10.1080/07352680390243495
- Sun SJ, Qi GN, Gao QF, Wang HQ, Yao FY, Hussain J, Wang YF (2016) Protein kinase OsSAPK8 functions as an essential activator of S-type anion channel OsSLAC1, which is nitrate-selective in rice. *Planta* 243 (2):489-500. doi:10.1007/s00425-015-2418-x
- Sussmilch FC, Brodribb TJ, McAdam SA (2017) What are the evolutionary origins of stomatal responses to abscisic acid in land plants? *J Integr Plant Biol* 59 (4):240-260. doi:10.1111/jipb.12523
- Szabados L, Savoure A (2010) Proline: a multifunctional amino acid. *Trends Plant Sci* 15 (2):89-97. doi:10.1016/j.tplants.2009.11.009
- Szekely G, Abraham E, Cselo A, Rigo G, Zsigmond L, Csiszar J, Ayaydin F, Strizhov N, Jasik J, Schmelzer E, Koncz C, Szabados L (2008) Duplicated P5CS genes of *Arabidopsis* play distinct roles in stress regulation and developmental control of proline biosynthesis. *Plant J* 53 (1):11-28. doi:10.1111/j.1365-313X.2007.03318.x
- Szostkiewicz I, Richter K, Kepka M, Demmel S, Ma Y, Korte A, Assaad FF, Christmann A, Grill E (2010) Closely related receptor complexes differ in their ABA selectivity and sensitivity. *Plant J* 61 (1):25-35. doi:10.1111/j.1365-313X.2009.04025.x
- Szyroki A, Ivashikina N, Dietrich P, Roelfsema MRG, Ache P, Reintanz B, Deeken R, Godde M, Felle H, Steinmeyer R, Palme K, Hedrich R (2001) KAT1 is not essential for stomatal opening. *P Natl Acad Sci USA* 98 (5):2917-2921. doi:DOI 10.1073/pnas.051616698
- Takemiya A, Sugiyama N, Fujimoto H, Tsutsumi T, Yamauchi S, Hiyama A, Tada Y, Christie JM, Shimazaki KI (2013) Phosphorylation of BLUS1 kinase by phototropins is a primary step in stomatal opening. *Nat Commun* 4. doi:ARTN 2094 10.1038/ncomms3094
- Tan BC, Joseph LM, Deng WT, Liu LJ, Li QB, Cline K, McCarty DR (2003) Molecular characterization of the *Arabidopsis* 9-cis epoxy-carotenoid dioxygenase gene family. *Plant J* 35 (1):44-56. doi:10.1046/j.1365-313X.2003.01786.x
- Tavakkoli E, Fatehi F, Coventry S, Rengasamy P, McDonald GK (2011) Additive effects of Na⁺ and Cl⁻ ions on barley growth under salinity stress. *J Exp Bot* 62 (6):2189-2203. doi:10.1093/jxb/erq422
- Temin HM, Mizutani S (1970) RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. *Nature* 226 (5252):1211-1213
- Thomas JC, Bohnert HJ (1993) Salt Stress Perception and Plant-Growth Regulators in the Halophyte *Mesembryanthemum-Crystallinum*. *Plant Physiol* 103 (4):1299-1304. doi:DOI 10.1104/pp.103.4.1299

- Thornton B, Basu C (2011) Real-Time PCR (qPCR) Primer Design Using Free Online Software. *Biochem Mol Biol Edu* 39 (2):145-154. doi:10.1002/bmb.20461
- Tischer SV, Wunschel C, Papacek M, Kleigrew K, Hofmann T, Christmann A, Grill E (2017) Combinatorial interaction network of abscisic acid receptors and coreceptors from *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114 (38):10280-10285. doi:10.1073/pnas.1706593114
- Tomlinson PB (1974) Development of the Stomatal Complex as a Taxonomic Character in the Monocotyledons. *Taxon* 23 (1):109-128. doi:10.2307/1218094
- Tripler E, Ben-Gal A, Shani U (2007) Consequence of salinity and excess boron on growth, evapotranspiration and ion uptake in date palm (*Phoenix dactylifera* L., cv. Medjool). *Plant Soil* 297 (1-2):147-155. doi:10.1007/s11104-007-9328-z
- Tsutsumi K, Yamada N, Cha-um S, Tanaka Y, Takabe T (2015) Differential accumulation of glycinebetaine and choline monoxygenase in bladder hairs and lamina leaves of *Atriplex gmelini* under high salinity. *J Plant Physiol* 176:101-107. doi:10.1016/j.jplph.2014.12.009
- Udvardi MK, Czechowski T, Scheible WR (2008) Eleven golden rules of quantitative RT-PCR. *Plant Cell* 20 (7):1736-1737. doi:10.1105/tpc.108.061143
- Ueda A, Yamamoto-Yamane Y, Takabe T (2007) Salt stress enhances proline utilization in the apical region of barley roots. *Biochem Bioph Res Co* 355 (1):61-66. doi:10.1016/j.bbrc.2007.01.098
- Uozumi N, Kim EJ, Rubio F, Yamaguchi T, Muto S, Tsuboi A, Bakker EP, Nakamura T, Schroeder JI (2000) The *Arabidopsis* HKT1 gene homolog mediates inward Na⁺ currents in *Xenopus laevis* oocytes and Na⁺ uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Plant Physiol* 122 (4):1249-1259. doi:DOI 10.1104/pp.122.4.1249
- Vahisalu T, Kollist H, Wang YF, Nishimura N, Chan WY, Valerio G, Lamminmaki A, Brosche M, Moldau H, Desikan R, Schroeder JI, Kangasjarvi J (2008) SLAC1 is required for plant guard cell S-type anion channel function in stomatal signalling. *Nature* 452 (7186):487-U415. doi:10.1038/nature06608
- Verbruggen N, Hermans C (2008) Proline accumulation in plants: a review. *Amino Acids* 35 (4):753-759. doi:10.1007/s00726-008-0061-6
- Verslues PE, Sharp RE (1999) Proline accumulation in maize (*Zea mays* L.) primary roots at low water potentials. II. Metabolic source of increased proline deposition in the elongation zone. *Plant Physiol* 119 (4):1349-1360. doi:DOI 10.1104/pp.119.4.1349
- Vlad F, Rubio S, Rodrigues A, Sirichandra C, Belin C, Robert N, Leung J, Rodriguez PL, Lauriere C, Merlot S (2009) Protein Phosphatases 2C Regulate the Activation of the Snf1-Related Kinase OST1 by Abscisic Acid in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 21 (10):3170-3184. doi:10.1105/tpc.109.069179
- Volkov V, Wang B, Dominy PJ, Fricke W, Amtmann A (2004) *Thellungiella halophila*, a salt-tolerant relative of *Arabidopsis thaliana*, possesses effective mechanisms to discriminate between potassium and sodium. *Plant Cell Environ* 27 (1):1-14. doi:DOI 10.1046/j.0016-8025.2003.01116.x
- Walker SE, Lorsch J (2013) RNA Purification - Precipitation Methods. *Method Enzymol* 530:337-343. doi:10.1016/B978-0-12-420037-1.00019-1
- Wang RS, Pandey S, Li S, Gookin TE, Zhao ZX, Albert R, Assmann SM (2011) Common and unique elements of the ABA-regulated transcriptome of *Arabidopsis* guard cells. *Bmc Genomics* 12. doi:Artn 216 10.1186/1471-2164-12-216
- Wang WX, Vinocur B, Altman A (2003) Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta* 218 (1):1-14. doi:10.1007/s00425-003-1105-5
- Waters S, Gilliam M, Hrmova M (2013) Plant High-Affinity Potassium (HKT) Transporters Involved in Salinity Tolerance: Structural Insights to Probe Differences in Ion Selectivity. *Int J Mol Sci* 14 (4):7660-7680. doi:10.3390/ijms14047660

- Webb AA, Hetherington AM (1997) Convergence of the abscisic acid, CO₂, and extracellular calcium signal transduction pathways in stomatal guard cells. *Plant Physiol* 114 (4):1557-1560
- Willmer C, Fricker M (1996) *Stomata*. Chapman & Hall Ltd, London
- Wu HH, Shabala L, Liu XH, Azzarello E, Zhou M, Pandolfi C, Chen ZH, Bose J, Mancuso S, Shabala S (2015) Linking salinity stress tolerance tissue-specific Na⁺ sequestration in wheat roots. *Frontiers in Plant Science* 6. doi:ARTN 71 10.3389/fpls.2015.00071
- Wu HJ, Zhang ZH, Wang JY, Oh DH, Dassanayake M, Liu BH, Huang QF, Sun HX, Xia R, Wu YR, Wang YN, Yang Z, Liu Y, Zhang WK, Zhang HW, Chu JF, Yan CY, Fang S, Zhang JS, Wang YQ, Zhang FX, Wang GD, Lee SY, Cheeseman JM, Yang BC, Li B, Min JM, Yang LF, Wang J, Chu CC, Chen SY, Bohnert HJ, Zhu JK, Wang XJ, Xie Q (2012) Insights into salt tolerance from the genome of *Thellungiella salsuginea*. *P Natl Acad Sci USA* 109 (30):12219-12224. doi:10.1073/pnas.1209954109
- Xing L, Zhao Y, Gao JH, Xiang CB, Zhu JK (2016) The ABA receptor PYL9 together with PYL8 plays an important role in regulating lateral root growth. *Sci Rep-Uk* 6. doi:ARTN 27177 10.1038/srep27177
- Xiong L, Zhu JK (2003) Regulation of abscisic acid biosynthesis. *Plant Physiol* 133 (1):29-36
- Xue SW, Hu HH, Ries A, Merilo E, Kollist H, Schroeder JI (2011) Central functions of bicarbonate in S-type anion channel activation and OST1 protein kinase in CO₂ signal transduction in guard cell. *Embo J* 30 (8):1645-1658. doi:10.1038/emboj.2011.68
- Yaish MW (2015) Proline accumulation is a general response to abiotic stress in the date palm tree (*Phoenix dactylifera* L.). *Genet Mol Res* 14 (3):9943-9950. doi:10.4238/2015.August.19.30
- Yaish MW, Kumar PP (2015) Salt tolerance research in date palm tree (*Phoenix dactylifera* L.), past, present, and future perspectives. *Front Plant Sci* 6:348. doi:10.3389/fpls.2015.00348
- Yaish MW, Patankar HV, Assaha DV, Zheng Y, Al-Yahyai R, Sunkar R (2017) Genome-wide expression profiling in leaves and roots of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) exposed to salinity. *BMC genomics* 18 (1):246
- Yamaguchi T, Aharon GS, Sottosanto JB, Blumwald E (2005) Vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter cation selectivity is regulated by calmodulin from within the vacuole in a Ca²⁺- and pH-dependent manner. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102 (44):16107-16112. doi:10.1073/pnas.0504437102
- Yamamoto Y, Negi J, Wang C, Isogai Y, Schroeder JI, Iba K (2016) The Transmembrane Region of Guard Cell SLAC1 Channels Perceives CO₂ Signals via an ABA-Independent Pathway in Arabidopsis. *Plant Cell* 28 (2):557-567. doi:10.1105/tpc.15.00583
- Yang YZ, Costa A, Leonhardt N, Siegel RS, Schroeder JI (2008) Isolation of a strong Arabidopsis guard cell promoter and its potential as a research tool. *Plant Methods* 4. doi:Artn 6 10.1186/1746-4811-4-6
- Yin P, Fan H, Hao Q, Yuan XQ, Wu D, Pang YX, Yan CY, Li WQ, Wang JW, Yan N (2009) Structural insights into the mechanism of abscisic acid signaling by PYL proteins. *Nat Struct Mol Biol* 16 (12):1230-U1242. doi:10.1038/nsmb.1730
- Yordanov I, Velikova V, Tsonev T (2000) Plant responses to drought, acclimation, and stress tolerance. *Photosynthetica* 38 (2):171-186. doi:Doi 10.1023/A:1007201411474
- Yoshida R, Hobo T, Ichimura K, Mizoguchi T, Takahashi F, Aronso J, Ecker JR, Shinozaki K (2002) ABA-activated SnRK2 protein kinase is required for dehydration stress signaling in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol* 43 (12):1473-1483. doi:DOI 10.1093/pcp/pcf188
- Yoshida R, Umezawa T, Mizoguchi T, Takahashi S, Takahashi F, Shinozaki K (2006) The regulatory domain of SRK2E/OST1/SnRK2.6 interacts with ABI1 and integrates abscisic acid (ABA) and osmotic stress signals controlling stomatal closure in Arabidopsis. *J Biol Chem* 281 (8):5310-5318. doi:10.1074/jbc.N509820200

- Youssef T, Awad MA (2008) Mechanisms of enhancing photosynthetic gas exchange in date palm seedlings (*Phoenix dactylifera* L.) under salinity stress by a 5-aminolevulinic acid-based fertilizer. *J Plant Growth Regul* 27 (1):1-9. doi:10.1007/s00344-007-9025-4
- Yuan F, Leng BY, Wang BS (2016) Progress in Studying Salt Secretion from the Salt Glands in Recretohalophytes: How Do Plants Secrete Salt? *Frontiers in Plant Science* 7. doi:ARTN 977
10.3389/fpls.2016.00977
- Zaid A, de Wet PF (2002) Date Palm Production.
- Zeevaart JAD, Boyer GL (1984) Accumulation and Transport of Abscisic-Acid and Its Metabolites in *Ricinus* and *Xanthium*. *Plant Physiol* 74 (4):934-939. doi:DOI 10.1104/pp.74.4.934
- Zhang JL, Flowers TJ, Wang SM (2010) Mechanisms of sodium uptake by roots of higher plants. *Plant Soil* 326 (1-2):45-60. doi:10.1007/s11104-009-0076-0
- Zhang M, Cao YB, Wang ZP, Wang ZQ, Shi JP, Liang XY, Song WB, Chen QJ, Lai JS, Jiang CF (2018) A retrotransposon in an HKT1 family sodium transporter causes variation of leaf Na⁺ exclusion and salt tolerance in maize. *New Phytol* 217 (3):1161-1176. doi:10.1111/nph.14882
- Zhao Y, Chan ZL, Gao JH, Xing L, Cao MJ, Yu CM, Hu YL, You J, Shi HT, Zhu YF, Gong YH, Mu ZX, Wang HQ, Deng X, Wang PC, Bressan RA, Zhu JK (2016) ABA receptor PYL9 promotes drought resistance and leaf senescence. *P Natl Acad Sci USA* 113 (7):1949-1954. doi:10.1073/pnas.1522840113
- Zhao Y, Chan ZL, Xing L, Liu XD, Hou YJ, Chinnusamy V, Wang PC, Duan CG, Zhu JK (2013) The unique mode of action of a divergent member of the ABA-receptor protein family in ABA and stress signaling. *Cell Res* 23 (12):1380-1395. doi:10.1038/cr.2013.149
- Zhao Y, Xing L, Wang XG, Hou YJ, Gao JH, Wang PC, Duan CG, Zhu XH, Zhu JK (2014) The ABA Receptor PYL8 Promotes Lateral Root Growth by Enhancing MYB77-Dependent Transcription of Auxin-Responsive Genes. *Sci Signal* 7 (328). doi:ARTN ra53
10.1126/scisignal.2005051
- Zhu JK (2002) Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annu Rev Plant Biol* 53:247-273. doi:10.1146/annurev.arplant.53.091401.143329
- Zhu JK (2003) Regulation of ion homeostasis under salt stress. *Curr Opin Plant Biol* 6 (5):441-445. doi:10.1016/S1369-5266(03)00085-2
- Zhu JK (2016) Abiotic Stress Signaling and Responses in Plants. *Cell* 167 (2):313-324. doi:10.1016/j.cell.2016.08.029
- Zhu JK, Liu JP, Xiong LM (1998) Genetic analysis of salt tolerance in *Arabidopsis*: Evidence for a critical role of potassium nutrition. *Plant Cell* 10 (7):1181-1191
- Zifarelli G, Pusch M (2010) CLC transport proteins in plants. *Febs Lett* 584 (10):2122-2127. doi:10.1016/j.febslet.2009.12.042
- Zou CS, Chen AJ, Xiao LH, Muller HM, Ache P, Haberer G, Zhang ML, Jia W, Deng P, Huang R, Lang D, Li F, Zhan DL, Wu XY, Zhang H, Bohm J, Liu RY, Shabala S, Hedrich R, Zhu JK, Zhang H (2017) A high-quality genome assembly of quinoa provides insights into the molecular basis of salt bladder-based salinity tolerance and the exceptional nutritional value. *Cell Res* 27 (11):1327-1340. doi:10.1038/cr.2017.124

6. Anhang

6.1 Anhang A: Primer

Arabidopsis thaliana

ABI1 fwd		5'-CTGCAATAACCAATACTC-3'
ABI1 rev	AT4G26080	5'-TCTTCTTCTCGCTAGTAA-3'
ABI2 fwd		5'-GGACTTAGAGGCTATTG-3'
ABI2 rev	AT5G57050	5'-AGGATTAAATCCATTAGTG-3'
ABR fwd		5'-ATAAAGATCCAAATGGACG-3'
ABR rev	AT3G02480	5'-GGTGAATGATGGACAAG-3'
Act2/8 fwd		5'-GGTGATGGTGTGTCT-3'
Act2/8 rev	AT1G49240/AT3G18780	5'-ACTGAGCACAATGTTAC-3'
CIPK25 fwd		5'-AGATCCAAAACGTAGAAG-3'
CIPK25 rev	AT5G25110	5'-CTTACACAACCTCAACGAC-3'
HAI1 fwd		5'-GTTGAATAGTTTTGACGA-3'
HAI1 rev	AT5G59220	5'-GCCGTATTTAGGATAAGC-3'
MYB60 fwd		5'-ATGCTGTGACAAGATAGG-3'
MYB60 rev	AT1G08810	5'-AAAGTTTCCACGTTTAAT-3'
KCR2 fwd		5'-ATGTGGATGCACTATCA-3'
KCR2 rev	AT1G24470	5'-AAGGTTATCCGGTACAA-3'
KIN2 fwd		5'-TCAGAGACCAACAAGAAT-3'
KIN2 rev	AT5G15970	5'-CGATATACTCTTTCCCGC-3'
PYR1 fwd		5'-GTGCATCGGTTTCGAG-3'
PYR1 rev	AT4G17870	5'-CACCTGAGAACCCTTCC -3'
PYL1 fwd		5'-CGTGAACGTGATAAGTGG-3'
PYL1 rev	AT5G46790	5'-TGAACCGTCGTAACCGAT -3'
PYL2 fwd		5'-CATAACCCAACGCATCCA -3'
PYL2 rev	AT2G26040	5'-AACTCAAGCCGCTCGGTA -3'
PYL4 fwd		5'-CCGCTCGTTTTACACACAC -3'
PYL4 rev	AT2G38310	5'-GTGTTGCCTGGAGGAACATC -3'
PYL5 fwd		5'-TGGTGCAGATGATCCACG-3'
PYL5 rev	AT5G05440	5'-AGACTGAAGGTTGCACCG-3'
PYL8 fwd		5'-TGTGTGGTCACTTGTGAGA-3'
PYL8 rev	AT5G53160	5'-TGAACCGCAAGACGTTCA-3'

Chenopodium quinoa

CqCBL4 fwd	CCG048771.1	5'-TCGGAAACGTAATTGTAA-3'
CqCBL4 rev	(AT5G24270)	5'-TCGCTCGTGGACTCT-3'
CqCIPK24 fwd	CCG019864.2	5'-CATGATAATGAATGCATTT-3'
CqCIPK24 rev	(AT5G35410)	5'-CTTATTAGCCGATATTCCT-3'
CqCLCc fwd	CCG018916.1/ CCG067813.1	5'-ATCTTAACGGTGTTGAT-3'
CqCLCc rev	(AT5G49890)	5'-CATACTTGCGAGAGC-3'
CqHAK5 fwd	CCG045154.1/ CCG044167.1	5'-GGAGATATTGGTACTTCG-3'
CqHAK5 rev	(AT4G13420)	5'-GGCAATTCAAGTTGGTA-3'
CqHAK6 fwd	CCG024117.1	5'-ATTGGGTCAAGGCTTAAA-3'
CqHAK6 rev	(AT1G70300)	5'-AACATGTGGGTTCCAGTG-3'
CqP5CS2 fwd	CCG065773.1	5'-ATCTTAGATCCGAAGGTGTT-3'
CqP5CS2 rev	(AT3G55610.1)	5'-ATGTGCACTTCCATGTTG-3'
CqProt2 fwd	TRINITY_DN108018	5'-CATGGGGCATCTATTT-3'
CqProt2 rev	(AT3G55740)	5'-GCACCTACGGCATT-3'
CqSLAH3 fwd	CCG055406.1/CCG044274.1	5'-CAAGAGCGGCAACTTA-3'
CqSLAH3 rev	(AT5G24030)	5'-CTTGTGGAAGACGAATTC-3'
CqSOS1 fwd	CCG057457.1/CCG038552.1	5'-TTRACTTGCCTCGTCTTTA-3'
CqSOS1 rev	(AT2G01980)	5'-TCATGAGCCATTATGTGA-3'

Phoenix dactylifera

PdEF1α fwd	XM_026802912.1	5'-CTGTTGCAACAAGATGGA-3'
PdEf1α rev	(AT5G60390)	5'-CCGAAGGTGACAACCATA-3'
PdHAK5 fwd	XM_026806672.1	5'-GACTACAGAATGTTCCGAT -3'
PdHAK5 rev	(AT4G13420)	5'-AAACTCTTTCTCCTCTTCAAC -3'
PdKT1 fwd	XM_008795639	5'-CTTCCGTCTCAAGTTGC-3'
PdKT1 rev	(AT1G60160)	5'-AAACAAGGACGACAGC-3'
PdNHX1 fwd	XM_026807250	5'-ACAGCCCTCGGAAGT-3'
PdNHX1 rev	(AT5G27150)	5'-GCCCACCAGACTATGAC-3'
PdSOS1 fwd	XM_026807192.1	5'-GTCTAGCTTTCGGAGTA-3'
PdSOS1 rev	(AT2G01980)	5'-CAACAACCTATGATTCGAG-3'

6.2 Anhang B: Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1: Lichtmikroskopische Aufnahme einer Spaltöffnung von <i>Arabidopsis thaliana</i>	18
Abbildung 1-2: Modell möglicher an der Salzbelastung der epidermalen Blaszellen (EBCs) von <i>C. quinoa</i> beteiligten Transportproteine.....	43
Abbildung 2-1: Übersicht der verwendeten <i>Arabidopsis</i> ABA-Rezeptormutanten.....	47
Abbildung 2-2: Habitus sechs Wochen alter <i>Arabidopsis thaliana</i> Wildtyppflanzen und der PYR/PYL-Rezeptormutanten	48
Abbildung 2-3: Epidermisfragment von <i>Arabidopsis thaliana</i> Col-0 nach der Schließzell-Aufreinigung durch Mixen	49
Abbildung 2-4: Habitus einer adulten <i>Chenopodium quinoa</i> Pflanze	52
Abbildung 2-5: Schematische Darstellung einer Dattelpalme (<i>Phoenix dactylifera</i>).	54
Abbildung 2-6: Schematische Darstellung der Gasflüsse in der eigens konstruierten Gaswechsellanlage	57
Abbildung 3-1: <i>Steady-State</i> Transpirations-raten der ABA-Rezeptormutanten	70
Abbildung 3-2: Auswirkung von ABA auf die lichtinduzierte Stomaöffnung von <i>Arabidopsis</i> ABA-Rezeptormutanten	72
Abbildung 3-3: ABA-Antwort einzelner Stomata der <i>Arabidopsis</i> ABA-Rezeptormutanten ...	73
Abbildung 3-4: Stomatäre CO ₂ -Antwort von <i>Arabidopsis</i> ABA-Rezeptor Mutanten.....	75
Abbildung 3-5: ABA-Sensitivität der ABA-Rezeptor Expression in Schließzellen von <i>Arabidopsis</i>	77
Abbildung 3-6: ABA-abhängige Expression typischer ABA-kontrollierter Gene.	78
Abbildung 3-7: ABA-induzierte Änderungen der Transkriptmenge ABA-regulierter Gene in Schließzellen von <i>Arabidopsis</i> Wildtyp-Pflanzen und den ABA-Rezeptormutanten	81
Abbildung 3-8: Stoma-Physiologie von Dattelpalmen und <i>Arabidopsis</i>	82
Abbildung 3-9: Fließgeschwindigkeit von DCMU im Leitgewebe von <i>Arabidopsis</i> und Dattelpalmen	84
Abbildung 3-10: Auswirkungen von Nitrat und Chlorid auf den ABA-induzierten Stomaschluss von <i>Phoenix dactylifera</i> und <i>Arabidopsis</i>	85

Abbildung 3-11: Natrium- und Kalium-Gehalt in Wurzeln und Fiederblättern von Dattelpalmen	87
Abbildung 3-12: Salzabhängige Expression von Natrium- und Kalium-Transportproteinen in Wurzeln von <i>Phoenix dactylifera</i>	89
Abbildung 3-13: Effekt einer fünfwöchigen Bewässerung mit 200mM NaCl auf das Wachstum von <i>C. quinoa</i>	91
Abbildung 3-14: Natrium- und Kalium-Gehalt in EBCs und Blättern von <i>Chenopodium quinoa</i>	92
Abbildung 3-15: In EBCs von <i>C. quinoa</i> differentiell exprimierte Transportproteine	97
Abbildung 3-16: Expression von Natrium-Transportproteinen in <i>C. quinoa</i> Blattgewebe, Wurzeln und EBCs.....	100
Abbildung 3-17: Expression von Chlorid-Transportproteinen in <i>C. quinoa</i>	102
Abbildung 3-18: Effekt von Salzstress auf die gewebespezifische Expression von Kaliumtransportsystemen sowie an der Prolinhomöostase beteiligter Transkripte in <i>C. quinoa</i>	103
Abbildung 3-19: Differentielle Expression von Lichtsammelkomplex-Proteinen in EBCs und Blattgewebe von <i>C. quinoa</i>	106

6.3 Anhang C: Tabellenverzeichnis

Tabelle 2-1: In dieser Arbeit verwendetes qPCR Programm	65
Tabelle 3-1: Änderungen der PYR/PYL Expression in Schließzellen von <i>Arabidopsis thaliana</i> in Microarrays durch verschiedene Stomaschluss-Signale.....	69
Tabelle 3-2: Vergleich errechneter und gemessener Natrium- und Kaliumkonzentrationen im Presssaft von <i>Chenopodium quinoa</i> Blättern.	94
Tabelle 3-3: Differentiell exprimierte Gene im Transkriptom der EBCs und Blätter von <i>C. quinoa</i>	95
Tabelle 3-4: Übersicht differentiell regulierter Stoffwechselwege in EBCs von Quinoa	105

6.4 Anhang D: Quinoa mRNA-Sequenzierungs Daten

Die Sequenzierungsergebnisse der *C. quinoa* EBC Transkriptom-Analyse wurden unter der Zugangsnummer E-MTAB-6112 in der EMBL-EBI Datenbank (www.ebi.ac.uk/arrayexpress) sowie der *BioProject number* PRJNA394652 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) abgelegt.

Die Transkriptomvergleiche von EBCs und Blattgewebe sowie die Auswirkungen der Salzbehandlungen sind unter [https://www.cell.com/current-biology/fulltext/S0960-9822\(18\)31049-2#secsectitle0230](https://www.cell.com/current-biology/fulltext/S0960-9822(18)31049-2#secsectitle0230) (Böhm*, Messerer*, Müller* et al. 2018) sowie in der beigefügten Exceltabellen auf dem Datenträger zu finden:

Tabelle S1: Differentiell exprimierte Gene in *C. quinoa* EBCs und Blatt unter Salzstress

6.5 Anhang E: Abkürzungsverzeichnis

Die in dieser Arbeit verwendeten physikalischen Größen entsprechen den gängigen SI-Einheiten und sind somit im Abkürzungsverzeichnis nicht weiter erklärt. Im Folgenden sind Abkürzungen beschrieben, die im Text nicht in ausführlicher Form erwähnt werden.

ABA	Abscisinsäure
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
bspw.	beispielsweise
bzw.	beziehungsweise
cDNA	komplementäre DNA (complementary DNA)
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
DCMU	3-(3,4-Dichlorphenyl)-1,1-dimethylharnstoff
d.h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure (deoxyribonucleic acid)
et al.	et alteres (lat.: und andere)
k	kilo (10^3)
m	milli (10^{-3})
mRNA	Boten-RNA (messenger RNA)
n	nano (10^{-9})
pH	negativer Logarithmus der H^+ -Konzentration
RNA	Ribonukleinsäure (ribonuclein acid)
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
Stabw	Standardabweichung (standard deviation)
SE	Standardfehler (standard error)
UV	Ultraviolettstrahlung
WT	Wildtyp
μ	mikro (10^{-6})

7. Eidesstattliche Erklärung und Danksagung

7.1 Eidesstattliche Erklärung §7 Abs. 2 Satz 3, 4, 5 der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation: „Anpassung an Trocken- und Salzstress: Untersuchungen an Modellpflanzen und Extremophilen“, eigenständig, d. h. insbesondere selbständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen, als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Weiterhin erkläre ich, dass bei allen Abbildungen und Texten bei denen die Verwertungsrechte (Copyright) nicht bei mir liegen, diese von den Rechtsinhabern eingeholt wurden und die Textstellen bzw. Abbildungen entsprechend den rechtlichen Vorgaben gekennzeichnet sind sowie bei Abbildungen, die dem Internet entnommen wurden, der entsprechende Hypertextlink angegeben wurde.

Affidavit

I hereby declare that my thesis entitled: „Adaptation to drought and salt stress: studies on model plants and extremophiles“ is the result of my own work. I did not receive any help or support from commercial consultants. All sources and / or materials applied are listed and specified in the thesis.

Furthermore I verify that the thesis has not been submitted as part of another examination process neither in identical nor in similar form.

Besides I declare that if I do not hold the copyright for figures and paragraphs, I obtained it from the rights holder and that paragraphs and figures have been marked according to law or for figures taken from the internet the hyperlink has been added accordingly.

Würzburg, den _____

Heike Müller

7.2 Danksagung

Im Folgenden möchte ich mich bei allen Personen bedanken, durch deren Unterstützung diese Dissertation erst möglich wurde. Mein besonderer Dank gilt daher:

Herrn Prof. Dr. Rainer Hedrich für die Bereitstellung der interessanten Themen sowie der Betreuung meiner Doktorarbeit. Besonderen Dank möchte ich für die sehr anregenden Diskussionen und die großartigen Ideen sowie die Hartnäckigkeit, die all das erst ermöglicht haben, aussprechen.

Herrn Prof. Dr. Arthur Korte für die Zweitbegutachtung dieser Dissertation.

Herrn Dr. Peter Ache danke ich ebenfalls für die Betreuung meiner Doktorarbeit, in der er mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand. Besonders möchte ich mich auch für die fast endlose Geduld bedanken, die er dabei an den Tag gelegt hat.

Ich möchte mich besonders bei allen Personen bedanken, die diese Dissertation durch Hilfe bei den Versuchen, zusätzliche Daten und Materialien erleichtert, erweitert und abgerundet haben. Danke an **Johannes C. B. Herrmann, Pamela Korte, Sarah Zehntner, Joachim Rothenhöfer, Hubert Bauer, Dr. Maxim Messerer, Dr. Marcus Dittlich und Pedro Rodriguez.**

Allen Mitarbeitern des Instituts für die große Hilfsbereitschaft und die kollegiale und freundschaftliche Atmosphäre. Ein besonderer Dank geht an **Dietmar and the Gang**, ich denke ihr wisst wofür!

Meinen Freunden und meinen Eltern, die mir stets beistanden und mich in Höhen und Tiefen begleiteten. **Mama und Papa**, danke dass Ihr mir in den vergangenen 30 Jahren alles in eurer Macht Stehende ermöglicht habt.

Herrn Spatz dafür, dass du nicht aufgehört hast zu sticheln und trotzdem an den Erfolg meiner Arbeit geglaubt hast.