

Abschlussbericht Teilprojekt 7

Klimaabhängige Steuerung des Wasserverlustes in Blättern

Projektverbund BayKlimaFit

Strategien zur Anpassung von Kulturpflanzen an den Klimawandel

Finanziert durch

Bayerisches Staatsministerium für
Umwelt und Verbraucherschutz
Rosenkavalierplatz 2
81925 München

Projektnehmer

Universität Würzburg
Julius-von-Sachs-Institut für Biowissenschaften
Prof. Dr. Rainer Hedrich
Julius-von-Sachs-Platz 2
97082 Würzburg
Tel.: +49 931 31-86100
Fax: +49 931 31-86157
E-Mail: hedrich@botanik.uni-wuerzburg.de
Web: <http://www.bot1.biozentrum.uni-wuerzburg.de/forschung/hedrich/>

Berichtszeitraum:

1. Februar 2016 bis 31. Januar 2019



finanziert durch
Bayerisches Staatsministerium für
Umwelt und Verbraucherschutz



Inhaltsverzeichnis

1	Kurzzusammenfassung	3
2	Einführung	4
3	Zielsetzung	6
4	Ergebnisse und Diskussion	8
4.1	Arbeitspaket 1: Funktionelle Charakterisierung der Gerstenstomata	8
4.2	Arbeitspaket 2: Funktionelle Profilierung des ABA-induzierten Stomaschlusses der Gerste	9
4.3	Arbeitspaket 3: Physiologie des Gersten Stomaschlusses	10
4.4	Arbeitspaket 4: Transkriptomanalyse von Schließ- und Nebenzellen	12
4.5	Arbeitspaket 5: Transkriptomanalyse der Schließ-/Nebenzellkomplexe unter ABA-Einwirkung	14
4.6	Arbeitspaket 6: Klonierung und funktionelle Charakterisierung schließzellrelevanter Transporter	15
4.7	Arbeitspaket 7: Freilandversuch – Screening nach Stomaphänotypen	18
4.8	Arbeitspaket 8: Validierung der aus dem Freilandversuch hervorgegangenen Linien unter Laborbedingungen	20
4.9	Arbeitspaket 9: Identifizierung von Markergenen	21
4.10	Stellungnahme zum Projekterfolg hinsichtlich der formulierten Projektziele	21
4.11	Voraussichtlicher Nutzen und Einordnung der Projektergebnisse mit Bezug zum Klimawandel	23
5	Veröffentlichungen	24
6	Vernetzungen zu weiteren Verbundpartnern	24
7	Bestehende und entstandene Industriebeteiligung	25
8	Zusammenfassung	25
9	Ausblick	26
	Literaturverzeichnis	27
	Abkürzungsverzeichnis	29

1 Kurzzusammenfassung

Im Projekt „Klimaabhängige Steuerung des Wasserverlustes in Blättern“ sollten in Gerste genetische Marker gefunden werden, die Züchtern helfen, stresstolerante Sorten zu identifizieren. Dabei wurde vor allem Trockenstress untersucht. Hierbei spielt das Wassermanagement der Pflanzen, das maßgeblich über Poren auf der Blattoberfläche, die Stomata, gesteuert wird, eine entscheidende Rolle. Die Stomaöffnungsweite, bedingt durch den Turgor der beiden beteiligten Schließzellen, ist entscheidend für den Wasserverlust über die Blätter. Daher ist ein optimierter Wasserhaushalt unter Trockenstress entscheidend von der Reaktion der Stomata auf die jeweilige Stresssituation abhängig. Hierbei kommt dem Stresshormon Abszinsäure (ABA) eine Schlüsselrolle zu.

Der Schließzellkomplex der Gerste besteht, wie bei allen Gräsern aus einem Schließzell- und einem Nebenzellpaar. Der Stomaschluss, eine erste makroskopische Antwort auf ABA, ist bei Gerste viel direkter als bei Nicht-Gräsern und auf das Zusammenspiel der Schließzellen mit ihren Nebenzellen zurückzuführen. Über die Natur dieser Zell-Zell-Kommunikation war bislang nahezu nichts bekannt. Zwischen beiden Zelltypen besteht ein Pendelverkehr in Bezug auf Signale, osmotisch wirksame Metabolite und Ionen. Die Aufklärung der Kommunikation zwischen diesen beiden Zelltypen war daher für die Identifikation möglicher Markergene der Gerste bzgl. Optimierung der Stomataeffizienz essentiell und stand im Fokus der Untersuchungen.

Die Ergebnisse des Projektes erlaubten einen molekularen Einblick in den Signal- und Stoffaustausch der Stomabewegung der Gerste hinsichtlich der Schließzell-/Nebenzellkomplexe. Letztlich konnte mit diesem Ansatz die ABA-Signalkette im Gerstenstomakomplex schon grob nachgestellt werden. Im nächsten Schritt wurden Unterschiede der ABA-Induktion von Schließ- und Nebenzellgenen untersucht und dann ausgewählte Gerstensorten transkriptionell unter Trockenstress miteinander vergleichen. Dabei konnten funktionelle Unterschiede erfasst werden, über die später die Markergenkandidaten validiert werden sollen.

2 Einführung

Im Zuge des Klimawandels ist in Bayern mit häufigeren Trockenperioden als bisher zu rechnen. Unter diesen Bedingungen stellt das Wassermanagement von Kulturpflanzen eine zu verbessernde Größe dar. Wasserverlust erfolgt über Stomata, mikroskopisch kleine, regelbare Poren in der Blattoberfläche. Der Öffnungszustand dieser Mikroventile wird durch spezielle Motorzellen – die Schließzellen – eingestellt. Der hydraulische Motor reagiert sowohl auf interne, als auch auf Umweltfaktoren, die über ein multisensorisches Netzwerk von den Schließzellen detektiert und in die jeweilige, situationsangepasste Stomabewegung umgesetzt werden. Um Kohlendioxid (CO₂) für die Photosynthese aufnehmen zu können, müssen die Stomata geöffnet werden. Ausbleibender Regen führt zu Wassermangel an der Wurzel. In dieser Stresssituation schließt die Pflanze ihre Stomata und vermeidet übermäßigen Transpirations-Wasserverlust. Trockenheitsresistente Pflanzen müssen einen Weg finden, die Stomaweite bezüglich Trockenstress und Wachstum (CO₂-Aufnahme/Eintrag von Kohlenstoff) zu optimieren.

Die Größe der stomatären Pore wird über Veränderungen des Schließzellvolumens gesteuert. Dabei wirkt bei der Stomaöffnung ein Blaulichtrezeptor zusammen mit Effektoren wie dem 14-3-3-Protein auf eine Protonen-ATPase, die über die Erzeugung eines Protonengradienten die Schließzellmembran energetisiert. Durch diese treibende Kraft werden Kaliumionen über einen Kanal in die Schließzellen eingebracht. Gleichzeitig strömen Anionen zusammen mit Protonen (A⁻/H⁺-Symport) und getrieben durch den Protonengradienten in die Zelle, Wasser folgt dem osmotischen Gefälle, wodurch das Schließzellvolumen steigt und sich die Stomata öffnen (**Abbildung 1 links**).

Unsere Arbeitsgruppe hat maßgeblich an der Aufklärung der Komponenten des Schließzellmotors mitgewirkt [1][2][3][4][5][6][7][8]. Dadurch ist z.B. die Wirkung des Trockenstresshormons Abszinsäure (ABA), dem wichtigsten Faktor bei der Regulation der Stomaöffnungsweite unter Stress, bei der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* nahezu vollständig verstanden. Beim ABA-induzierten Stomaschluss wird ABA von einem Rezeptor gebunden, der in diesem aktivierten Zustand eine Phosphatase des PP2C-Typs inaktiviert. Dadurch werden ABA-angesteuerte Kinasen zugeschaltet, die ihrerseits Anionenkanäle (SLAC1, SLAH3) aktivieren. Der anschließende Anionenausstrom depolarisiert die Schließzellmembran, wodurch der Kaliumabgabekanal GORK aktiviert wird. In der Folge strömt Wasser nach, das Schließzellvolumen verringert sich, die Stomata schließen (**Abbildung 1 rechts**). Dieser Vorgang wird auf Protein- und Gen-Ebenen reguliert, weshalb zu erwarten war, über die Analyse der Schließzell-Genexpression Markergene für die Stressoptimierung von Gersten-Stomata zu finden. Darüber hinaus konnte die Arbeitsgruppe zeigen, dass Schließzellen bei Trockenstress, bedingt durch starkes Absinken der Luftfeuchte, autonom über ABA-vermittelte Signalwege den Stomaschluss herbeiführen können [9][10].

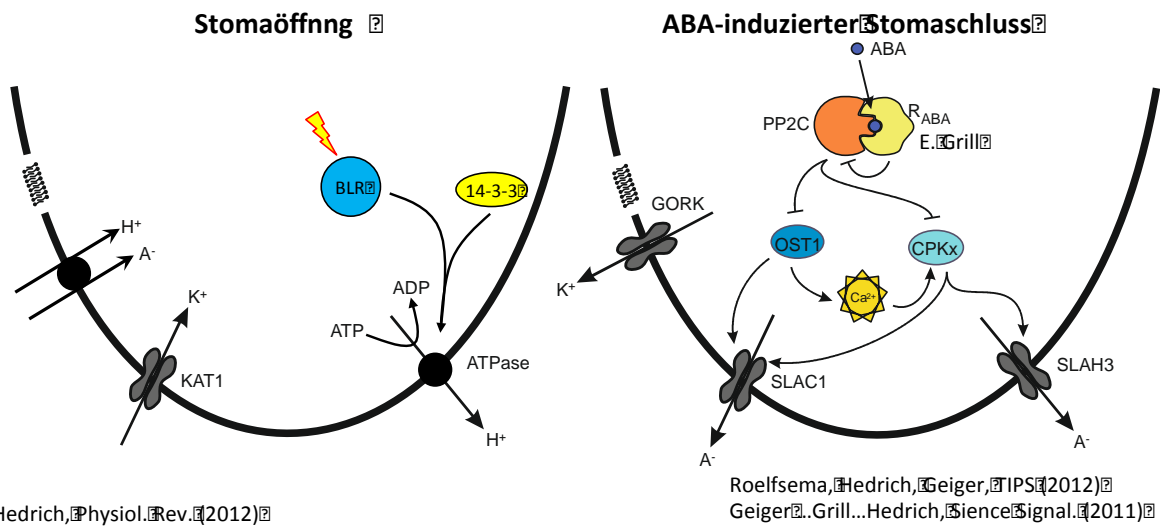


Abbildung 1: Mechanismen der Stomaöffnung und des ABA-induzierten Stomaschlusses.

Das Forschungsobjekt Gerste stellt nun besondere Anforderung, da in Gräsern Schließzellen eine funktionelle Einheit mit ihren nächsten Nachbarn, den Nebenzellen, bilden. Hier gilt es die molekulare Ausstattung von Schließ- und Nebenzellen im Detail zu verstehen, um den Pendelverkehr der osmotisch aktiven Moleküle zwischen den beiden Zelltypen des Gerbestomas unter Stress aufzuklären. Erste Erfahrungen mit den Schließzell-/Nebenzellkomplexen von Mais und auch Gerste wurden bereits im Vorfeld des Projektes gesammelt [11][12][13].

3 Zielsetzung

Erste Überprüfungen des Gerstengenoms hatten gezeigt, dass Komponenten des oben dargestellten Schließzell-Signalweges der Modellpflanze Arabidopsis auch bei der Gerste vorhanden sind. Daraus folgte, dass bei Modell- und Kulturpflanze grundsätzlich die gleichen ABA Signalwegkomponenten vorliegen. Im nächsten Schritt sollten die Arbeitsteilung zwischen Schließ- und Nebenzellen der Gerste-Stomata beim ABA-induzierten Stomaschluss aufgeschlüsselt werden. Hierfür sollten in verschiedenen Arbeitspaketen generelle physiologische und transkriptionelle Parameter der Gerstenstomata bestimmt werden. Dabei sollte auch überprüft werden, ob bei Modell- (Arabidopsis) und Kulturpflanze (Gerste) exakt die gleichen Mechanismen vorliegen, oder ob der Aufbau aus Schließ- und Nebenzelle andere Komponenten benötigt. Für die Identifizierung züchtungsrelevanter Markergene sollte die Aktivität dieser Mechanismen bei Gerstensorten mit unterschiedlicher Stressreaktion verglichen werden. Als Referenzsorte wurde „Barke“ gewählt, die nach Analyse durch die LfL weder ausgeprägte Sensitivität noch Toleranz gegenüber Trockenheit und Hitze zeigte. Der Vergleich besonders stresstoleranter und sensibler Sorten mit der Referenzgerste sollte dann zur Identifizierung züchtungsrelevanter Markergene führen. Diese Ziele wurden in folgenden Arbeitspaketen behandelt:

Arbeitspaket 1: Detailanalyse der funktionellen Eigenschaften des Stomakomplexes

Arbeitspaket 2: Inspektion des ABA-induzierten Stomaschlusses der Referenzsorte „Barke“

Arbeitspaket 3: Arbeitsteilung von Schließ- und Nebenzellen beim Stomaschluss

Arbeitspaket 4: Transkriptomanalyse der Schließzell-/Nebenzellkomplexe

Erstes Ziel im Paket 4 war die RNA-Probengewinnung aus Gerstenschließ- und Nebenzellen. Dazu musste zunächst eine Methode entwickelt werden, um die beiden Zelltypen transkriptionell voneinander unterscheiden zu können. Dann sollten stressassoziierte Schließzell-Signalkettenkomponenten und -Schlüsselgene an der Referenzgerste mittels qPCR und RNA-Sequenzierung identifiziert werden. Bei den Analysen sollten Erkenntnisse von Arabidopsis auf die Gerste übertragen und orthologe Gene in der Gerste gesucht und den Schließ- oder Nebenzellen zugeordnet werden.

Arbeitspaket 5: Transkriptomanalyse der Schließzell-/Nebenzellkomplexe unter ABA-Einwirkung. Mit diesem Ansatz sollen Unterschiede der transkriptionellen ABA-Reaktion der Gerste im Vergleich zu Arabidopsis herausgearbeitet werden.

Arbeitspaket 6: Klonierung der wichtigsten an der Stomabewegung der Gerste beteiligten Transporter und deren funktionelle Analyse. Dabei sollten sowohl schließzell-, als auch nebenzellspezifische Transporter berücksichtigt werden. In diesem Paket wurde u.a. SLAC1, der wichtigste an der Stomabewegung der Gerste beteiligte Transporter, kloniert und dessen Funktion analysiert.

Arbeitspaket 7: Aus einer Kollektion von ca. 100 Genotypen wurden 59 Linien ausgewählt, die sich in ihrer Stresstoleranz unterscheiden und im kontrollierten Feldversuch nach auffälligen Unterschieden in der Transpiration durchgemustert. Dabei wurden besonders wassersparende und -verschwendende Linien identifiziert und für weitergehende Analysen ausgewählt.

Arbeitspaket 8: Validierung der aus dem Freilandversuch hervorgegangenen Linien unter Laborbedingungen. Hierbei wurden die jeweils trockenstresstoleranteste (beste) und die -sensitivste (schlechteste) Sorte ermittelt.

Arbeitspaket 9: Schließ-/Nebenzellkomplexe aus dem finalen Trockenstressexperiment der besten, schlechtesten und der Referenzsorte unter Laborbedingungen wurden einer RNA-Sequenzierung unterworfen. Über die Analyse dieser Daten sollen die Markergene für Trockenstresstoleranz identifiziert und den Züchtern zur Validierung zur Verfügung gestellt werden.

4 Ergebnisse und Diskussion

Im Projekt sollten die Komponenten des Stomaschlusses der Gerste im Hinblick auf das bislang wenig untersuchte Wechselspiel zwischen Schließ- und Nebenzellen herausgearbeitet werden. Dabei wurde die Wirkung des Trockenstresshormons ABA auf den Gersten-Stomakomplex genauer untersucht. Der Fokus lag auf der Analyse der gegenläufigen aber synergistischen Vorgänge in den Schließ- und Nebenzellen. Im weiteren Verlauf sollten die Kandidaten der verschiedenen Genotypen identifiziert werden, die am besten für die Ermittlung trockenstressrelevanter Markergene geeignet schienen. Dazu sollten die Stomakomplexe ausgewählter Linien Stressbedingungen unterworfen und bzgl. auffallendem Transkriptionsverhalten inspiziert werden.

4.1 Arbeitspaket 1: Funktionelle Charakterisierung der Gerstenstomata

Wie alle Gräser verfügt auch die Gerste über einen Komplex aus Stomata und Nebenzellen. Welche Transportprozesse bei der Stomabewegung zwischen diesen beiden Zelltypen eine Rolle spielen ist bislang nur wenig bekannt. Darum wurde an der Referenzsorte Barke zunächst die Stomabewegung mittels Infrarot-Gasanalyse (IRGA) untersucht. Zunächst wurde die optimale Lichtstärke innerhalb der natürlichen Grenzen der Sonnenstrahlung Bayerns ermittelt, bei der sich die Stomata öffnen (**Abbildung 2A**). Dabei zeigte sich, dass die Gerste mit 400 μE im optimalen Bereich für Feld und Laborexperimente liegt. In einer nachfolgenden Versuchsreihe wurde geprüft, wie sich Barke in Bezug auf Licht – Dunkelheit-Wechsel verhält. Dabei zeigte sich, dass sich Gersten Stomata – im Vergleich mit anderen Kulturpflanzen – ungewöhnlich schnell öffnen und schließen können (**Abbildung 2B**).

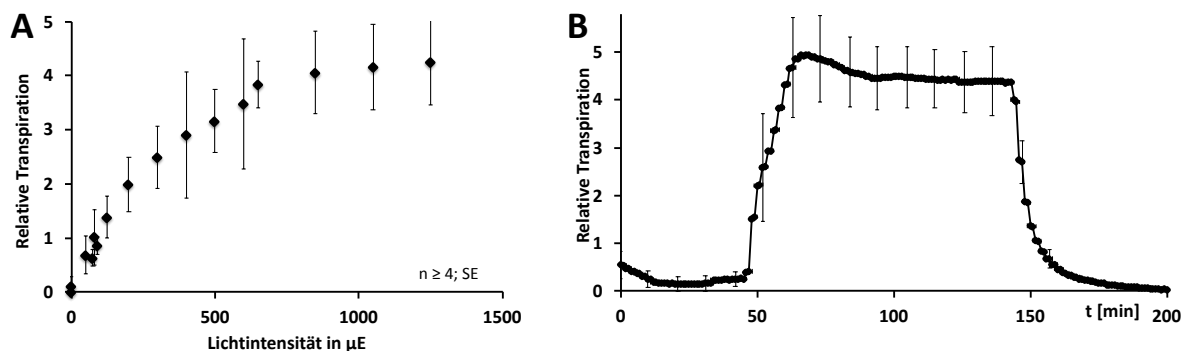


Abbildung 2: Infrarot-Gasaustauschmessungen (IRGA) und Welketest an der Referenzgerste „Barke“ (A) Lichtkurve, (B) Stomabewegung auf Licht-Dunkel-Wechsel.

4.2 Arbeitspaket 2: Funktionelle Profilierung des ABA-induzierten Stomaschlusses der Gerste

Mit der Infrarot-Gasanalyse (IRGA) wurde neben dem Licht-Dunkel-Verhalten auch das Stomaschlussverhalten nach Gabe des Stresshormons ABA untersucht. In ca. 85% der Experimente fiel der Stomaschluss auffallend verzögert und unvollständig aus (**Abbildung 3 links**).

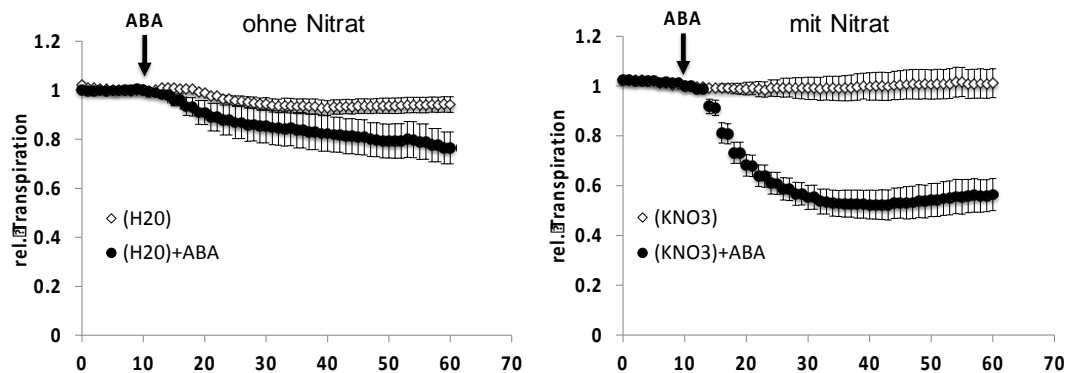


Abbildung 3: Nur in Anwesenheit von Nitrat führt ABA zum Stomaschluss. IRGA Messungen der relativen Transpiration als Funktion der Stomaöffnungsweite. ABA-Applikation über den Transpirationsstrom. (links) Ohne Nitrat ist der Stomaschluss marginal und langsam. (rechts) In Anwesenheit von Nitrat erfolgte der Stomaschluss schnell und weitgehend vollständig. Nitrat alleine bewirkte keine Veränderung.

Durch Voruntersuchungen hatten wir Grund zur Annahme, dass der Gegenwart von Nitrat eine entscheidende Rolle beim Stomaschluss von monokotylen Pflanzen zukommt [14]. Deshalb wurde in Folgeexperimenten Nitrat zugesetzt (**Abbildung 3 rechts**) und unsere Annahme auch für Gerste bestätigt. Bei der nitratabhängigen Optimierung des Stomaschlusses sind wir auf die Nitratbedürftigkeit des Schließzell-Anionenkanals HvSLAC1 gestoßen (siehe unten).

4.3 Arbeitspaket 3: Physiologie des Gersten Stomaschlusses

Um die ABA-Antwort der Referenzlinie „Barke“ auch auf der Ebene einzelner Stomata untersuchen zu können, wurden Schließzellen intakter Gerstenblätter mittels der von uns entwickelten Nanoinfusionstechnik [15] mit ABA behandelt und der eintretende Stomaschluss mit der Mikroskopkamera verfolgt (**Abbildung 4A**). Der ABA induzierte Stomaschluss erfolgte vollständig und reproduzierbar und war mit ca. 10 Minuten sehr schnell (**Abbildung 4B**). Mit dieser Methode und der IRGA-Messung konnte nun die ABA-Antwort der Gersten-Stomata im Detail untersucht werden.

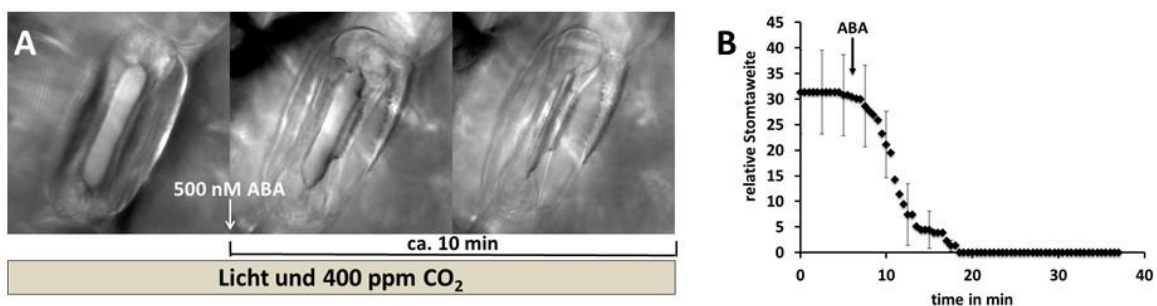


Abbildung 4: Der ABA-Effekt auf einzelne Gersten-Stomakomplexe lässt sich am intakten Blatt verfolgen. (A) Das vollständig geöffnete Stoma (links) wird mit ABA überspült (mitte) und ist innerhalb von 10 Minuten geschlossen (rechts), (B) Die relative Stomataweite wurde nach ABA-Gabe verfolgt und gegen die Zeit aufgetragen.

Die Stomabewegung bei der Gerste erfolgt, verglichen mit der Modellpflanze Arabidopsis, sehr schnell. Das Zusammenspiel von Schließ- (SZ) und Nebenzellen (NZ) scheint hierfür verantwortlich zu sein. Hierbei können vor allem Ionen und Wasser sehr schnell zwischen beiden Zelltypen ausgetauscht werden (**Abbildung 5**).

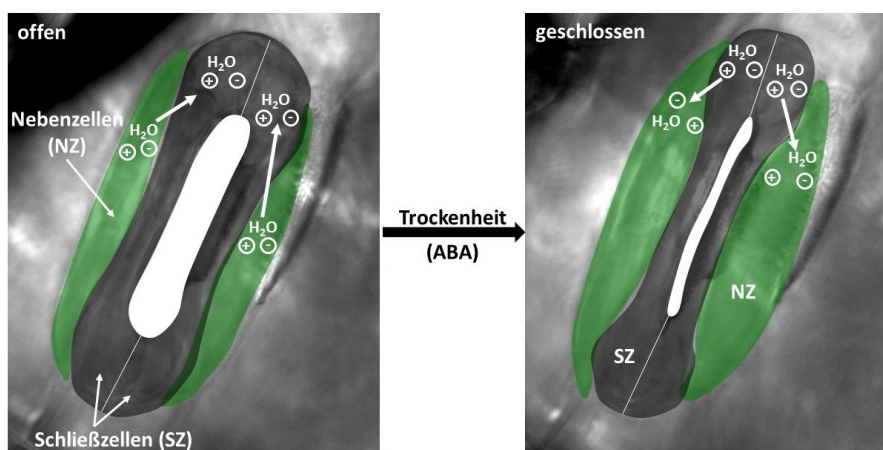


Abbildung 5: Ionen und Wasseraustausch zwischen SZ und NZ. Bei Gräsern wie der Gerste bilden zwei Schließzellen (SZ) mit zwei Nebenzellen (NZ) eine funktionelle Einheit, zwischen denen ein Pendelverkehr von Ionen und Wasser besteht. Beim Öffnen der Stomata findet dieser Verkehr von den Nebenzellen zu den Schließzellen statt (links), beim Stomaschluss invers (rechts).

Wir haben diesen Vorgang mit der Nanoinfusionstechnik über die Zeit verfolgt und dann die Flächenänderungen stellvertretend für Volumenänderungen von SZ, NZ und der Öffnungsweite der stomatären Pore aus den Bilddaten berechnet (**Abbildung 6A**). Wie zu erwarten war, wird die Zunahme des NZ-Volumens (grüner Pfeil) von der gleichzeitigen Abnahme des SZ-Volumens (schwarzer Pfeil) begleitet. Mit der Abnahme des Schließzellvolumen schließt sich Zug um Zug der stomatäre Spalt (roter Pfeil). Dieser Befund legt nahe, dass die NZ aktiv die benachbarten SZ zusammendrücken und dadurch den schnellen Stomaschluss unterstützen. Um herauszufinden welche Ionenveränderungen hierbei eine Rolle spielen wurde mittels Energiedispersiver-Röntgenspektroskopie-Analyse (EDXA) der Gehalt von Kalium und Chlorid bei offenen und geschlossenen Stomakomplexen bestimmt (**Abbildung 6B**). Es zeigte sich, dass die Abnahme beider Ionen in den SZ der Zunahme in den NZ entsprach. Interessanterweise ist dabei die verschobene Menge Chlorid nicht identisch mit der Kaliummenge, was als Hinweis auf die Beteiligung weiterer Anionen an diesem Prozess gewertet wurde.

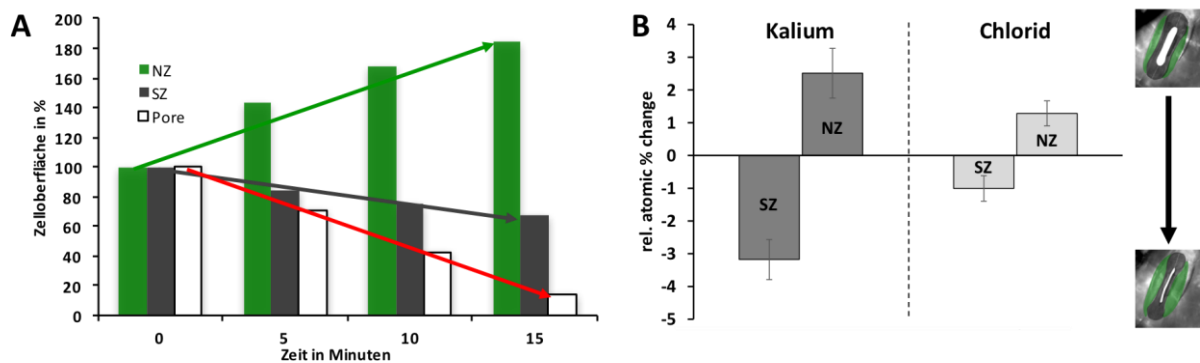


Abbildung 6: Wechselseitige Ionenverschiebung beim Übergang von offenen zu geschlossenen Stomata. (A) Die Zelloberfläche der NZ nimmt zu, die der SZ nimmt ab. Der stomatäre Spalt schließt sich schnell. (B) EDX-Analyse zeigt entsprechende Verschiebungen von Kalium und Chlorid von den SZ zu den NZ.

Die Ergebnisse aus diesem Arbeitspaket machten klar, dass die Stomabewegung der Gerste nicht mit der von Arabidopsis gleichgesetzt werden kann, da durch die SZ/NZ-Architektur weitere Komponenten ins Spiel kommen.

4.4 Arbeitspaket 4: Transkriptomanalyse von Schließ- und Nebenzellen

In unserem Kernexperiment bezüglich Trockentoleranz mit der „besten“ und „schlechtesten“ stressangepassten Sorte im Vergleich zur Referenzsorte „Barke“ sollten Stressbewältigungsgene als potentielle Marker für die Züchtung von Gerste mit klimaangepassten Schließzellen identifiziert werden. Hierfür muss man zunächst verstehen, wie Schließ- und Nebenzellen der Gerste zusammenarbeiten. In einem ersten Ansatz haben wir RNA von ganzen Blättern und isolierter Epidermis mit Schließzell-/Nebenzellkomplexen extrahiert (**Abbildung 7A**), RNA Profilierung der Proben mittels RNAseq durchführen lassen und die differenzielle Genexpressionsanalyse bioinformatisch durch unseren Helmholtz-Verbundpartner (Manuel Spannagel) analysiert bekommen.



Abbildung 7: RNAseq von ganzen Stomakomplexen zeigt, dass die Gene für den ABA-Signalweg vorhanden sind. (A) Vitalfärbung von Stomakomplexen an Epidermistreifen der Gerste. Besonders stark angefärbt sind die großen Vakuolen der Nebenzellen. Dazwischen sind die kleinen hantelförmigen Schließzellen zu erkennen. (B) RNAseq-Analyse: Verteilung relevanter ABA-Signalweg- und lichtabhängiger Gene. Die Spalte GC/L zeigt das Verhältnis der jeweiligen Signalstärken in Schließzell-/Nebenzellkomplexen (GC) zu Gesamtblättern (L). Dabei bedeuten positive Werte höhere Expression im Schließzellkomplex und negative höhere Expression im Blatt

In diesem Datensatz konnten wir nahezu alle Komponenten des ABA-induzierten Stomaschlusses finden und dem Schließzell-/Nebenzellkomplex zuordnen (**Abbildung 7B**). Darüber hinaus haben wir auch den für die Stomaöffnung relevanten Kaliumkanal KAT1 identifiziert und Gene, die wie PHOT1 und 2 mit der lichtabhängigen Stomaöffnung zusammenhängen, verstärkt dem Blatt zuordnen können. Mit diesem Datensatz haben wir einen ersten Einblick in Komponenten der Gersten-Stomabewegung gewonnen. Die Sequenzinformation konnte für die Klonierung stressrelevanter Transporter genutzt werden (s. Arbeitspaket 6).

Da unser vorrangiges Interesse der funktionsbedingten Zuordnung der Stressgene auf Schließ- und Nebenzellen galt, wurde versucht, beide Zelltypen voneinander zu trennen. Dazu wurden an „Barke“ Schließzellen durch selektive Zerstörung der mechanisch labileren Nebenzellen aufgereinigt [9]. So erhielten wir zwei Fraktionen: Schließzellen gepaart mit Nebenzellen und nebenzellfreie Stomakomplexe (**Abbildung 8 links**). Von beiden Fraktionen wurde RNA isoliert, sequenziert und die Profile analysiert. Aus der Differenz von SZ/NZ-Proben und den reinen SZ-Fraktionen konnten wir dann feststellen, dass von den insgesamt fast 38.000 sequenzierten Transkripten der Gerste etwa 4.600 präferentiell in SZ und 4.000 deutlich höher in NZ exprimiert werden. Interessanterweise fanden sich nahezu alle Transkripte des ABA-Signalweges ausschließlich in den SZ (**Abbildung 8 rechts, rot umrandet**). Soweit scheint sich also der ABA-Weg zwischen Gerste und Arabidopsis zunächst nicht zu unterscheiden. Daher ist zu vermuten, dass in den Nebenzellen eine gänzlich andere Steuerung vorliegen muss. Bisher konnten wir feststellen, dass in beiden Zelltypen unterschiedliche Transporter und regulatorische Proteine auftauchen.

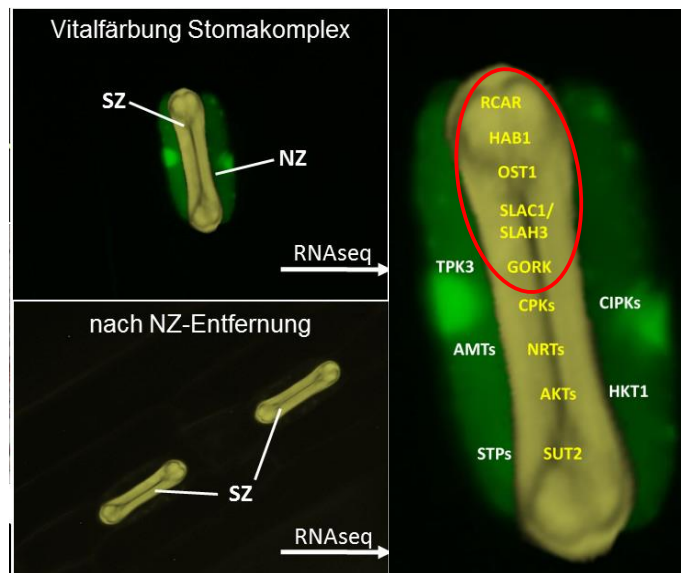


Abbildung 8: Schlüsselkomponenten der Stomabewegung. (links) Isolierte SZ/NZ Komplexe (oben) und reine SZ-Fraktion, Darstellung in Falschfarben. (rechts) Schließ- und Nebenzell-spezifische Transkriptverteilung, rot umrahmt Gene des ABA-Signalweges.

Grundsätzlich scheinen die Prozesse, die während der Gerste-Stomabewegung in SZ und NZ ablaufen, gegenläufig gesteuert zu werden. Dabei stellte sich die Frage, ob dies auch für den ABA-Signalweg gilt. So finden sich z.B. in SZ für den Kaliumtransport vorwiegend Kanäle (AKTs), während in NZ eher hoch affine Transporter des HKT-Typs und vakuoläre des TPK-Kanaltyps auftauchen, Zucker werden in SZ eher als Saccharosen (SUT) und in NZ als Hexosen (STPs) transportiert, Stickstoff als Nitrat in den SZ (NRTs) und als Ammonium in den NZ (AMTs), während regulatorische Kinasen in den SZ vorwiegend vom CPK- und in NZ vom CIPK-Typ sind.

4.5 Arbeitspaket 5: Transkriptomanalyse der Schließ-/Nebenzellkomplexe unter ABA-Einwirkung

Es sollte geklärt werden, wie sich der Transport osmotisch aktiver Substanzen beider Zelltypen unter Trockenstress verhält. Daher erschien es unabdingbar, zusätzlich zu unserer ursprünglichen Planung das Transkriptom von Schließ- und Nebenzellen nach ABA-Behandlung zu untersuchen. Dafür wurden Blätter mit ABA besprüht und im Gaswechsel nachgewiesen, dass die Gabe des Welkehormons die Stomaöffnung im Licht verhindert (**Abbildung 9**).

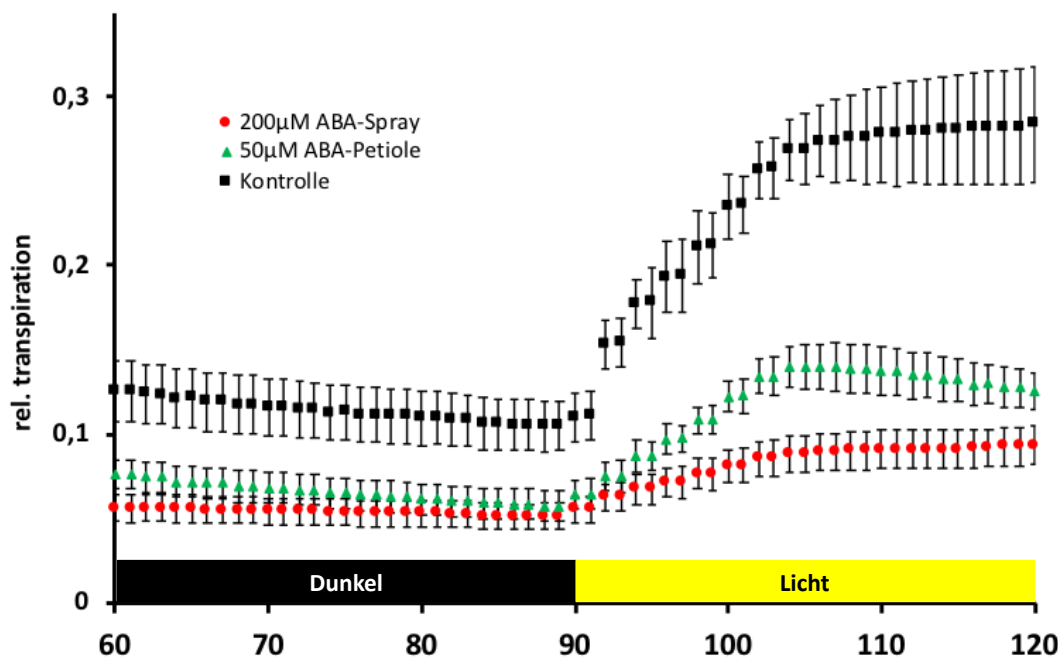


Abbildung 9: ABA blockiert die Stomaöffnung im Licht. Vorinkubation mit ABA über Spray an intakten Pflanzen führt noch mehr als über Petiolenfütterung an abgeschnittenen Blättern im Dunkel dazu, dass nach Einsetzen der Belichtung die Stomata kaum geöffnet werden.

Um die Wirkung von ABA auf die transkriptionelle Regulation bei der Gerste zu untersuchen, wurden stomatäre Komplexe isoliert und die RNA Profile untersucht. Die Wirkung von ABA ist eng mit der von GABA (Gamma-Aminobuttersäure) verknüpft. In Zusammenarbeit mit unserem australischen Kooperationspartner Prof. Matthew Gilliham von der Universität in Adelaide haben wir herausgefunden, dass GABA auf den ABA-Signalweg einwirkt und dadurch die Trockenstressantwort der Pflanzen mitbestimmt. Darum wurden Gerstenblätter neben ABA auch mit GABA behandelt und der RNA-Sequenzierung zugeführt. So konnte Aufschluss über die ABA-/GABA-Expressionsregulation der Schließ- und Nebenzellen der Gerste erhalten werden (s. Arbeitspaket 7).

4.6 Arbeitspaket 6: Klonierung und funktionelle Charakterisierung schließzellrelevanter Transporter

Mit den orthologen Sequenzen der Gerste- aus Arbeitspaket 4 wurden verschiedene Transporter der Schließzellen kloniert, die mit der Regulation der Stomaöffnungsweite und der Trockenstress-Antwort in Verbindung gebracht werden können. Für deren funktionelle Charakterisierung haben wir uns der heterologen Expression in *Xenopus* Oozyten und der Zwei-Elektroden-Spannungsklemmen-Technik (TEVC) bedient. So ist es uns gelungen, einen Anionenkanal mit starker Homologie zu SLAC/SLAH-Anionenkanälen (siehe **Abbildung 1**) zu klonieren und elektrophysiologisch zu untersuchen (**Abbildung 10**).

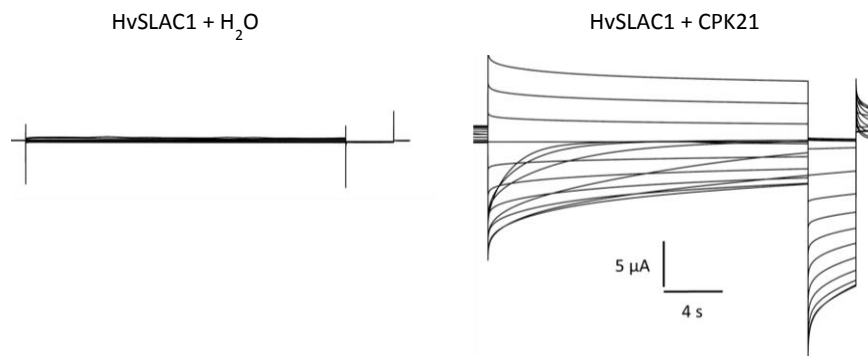


Abbildung 10: TEVC an *Xenopus* Oozyten. Dargestellt sind die Ströme einer Oozyte, die den Gerste-Anionenkanal HvSLAH3 in Anwesenheit von 100 mM NO_3^- exprimiert (links). Makroskopische Anionenströme sind erst zu detektieren, sobald zusätzlich die regulatorische Kinase CPK21 koexprimiert wird (rechts).

Zudem ist es uns gelungen, die Funktion des Kationenkanales HvKAT1 (**Abbildung 11links**) und eines Kaliumtransporters vom Typ HvHAK5 nachzuweisen (**Abbildung 11rechts**).

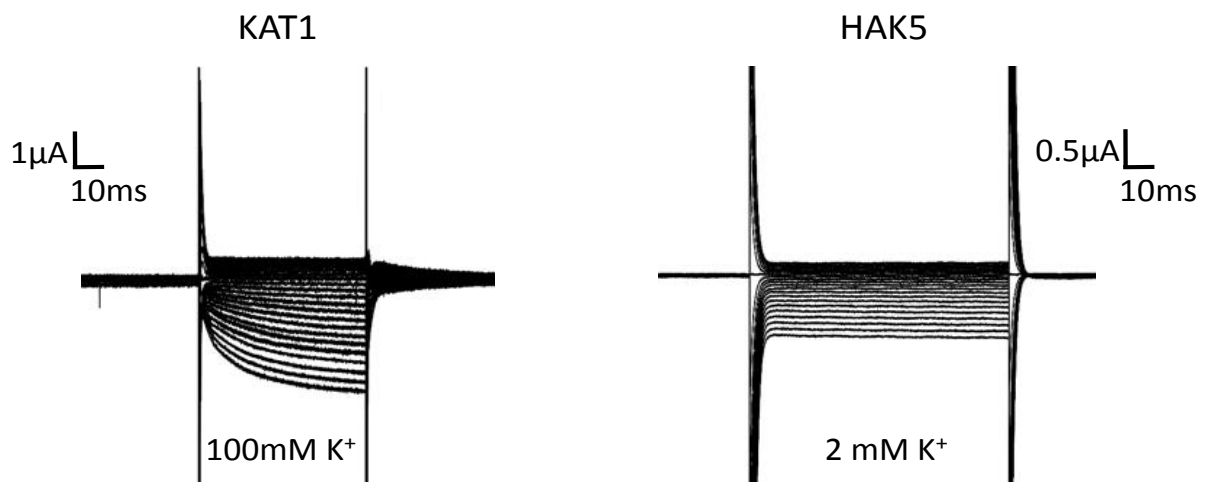


Abbildung 11: Kaliumaufnahme-Transporter aus Gerste Schließzellen. Dargestellt sind die Ströme von Oozyten, die Gerste Kationen-Kanäle exprimieren. Der niederaffine Kalium-einwärtsgleichrichter HvKAT1 (links) zeigt einen spannungsabhängigen Einstrom bei 100 mM K^+ , während der hochaffine Kaliumkanal HvHAK5 schon bei 2 mM externen K^+ Transportaktivitäten aufweist (rechts).

Mit diesen Kanälen sind bereits drei entscheidende schließzelllokalisierte Komponenten von Stomaöffnung und Stomaschluss identifiziert. Da der ABA-induzierte Stomaschluss bei der Gerste nur in Anwesenheit von Nitrat effizient verläuft, wurde zunächst der entscheidende Anionenkanal HvSLAC1 kloniert und mittels der Zwei-Elektroden-Spannungsklemmen-Technik (TEVC) funktionell charakterisiert. Tatsächlich benötigte auch dieser Kanal Nitrat, um in den aktiven Zustand überführt zu werden (**Abbildung 12A**).

Um dieses nitratabhängige Schalten des Anionenkanals im Detail zu untersuchen, wurde eine phylogenetische Analyse von SLAC1 Kanälen aus ein- und zweikeimblättrigen Pflanzenspezies durchgeführt. Dabei fielen 2 Aminosäuren auf, die im 3D-Modell des Kanals im Porenbereich zu finden waren (**Abbildung 12B, rote Positionen**). Sequenzvergleiche von nitratabhängigen und nitratunabhängigen SLAC1-Varianten zeigten, dass es sich dabei um die Kombinationen Valin-Valin (VV) in nitratunabhängigen zweikeimblättrigen SLAC1s, bzw. einer Kombination aus Isoleucin-Alanin (IA) in einkeimblättrigen Pflanzen, wie z.B. der Gerste handelt (**Abbildung 12C**). Wir konnten dann den nitratunabhängigen SLAC1 von Arabidopsis durch Austausch des VV gegen das IA Motiv in einen nitratabhängigen Kanal konvertieren und so unsere Hypothese bestätigen. Weitere Struktur-Funktionsuntersuchungen zeigten schließlich, dass das IA-Motiv auf der Transmembran Domäne 3 zusammen mit den Transmembrandomänen 1 und 2 den Nitratsensor in Monokotyledonen SLAC1 Kanälen bildet.

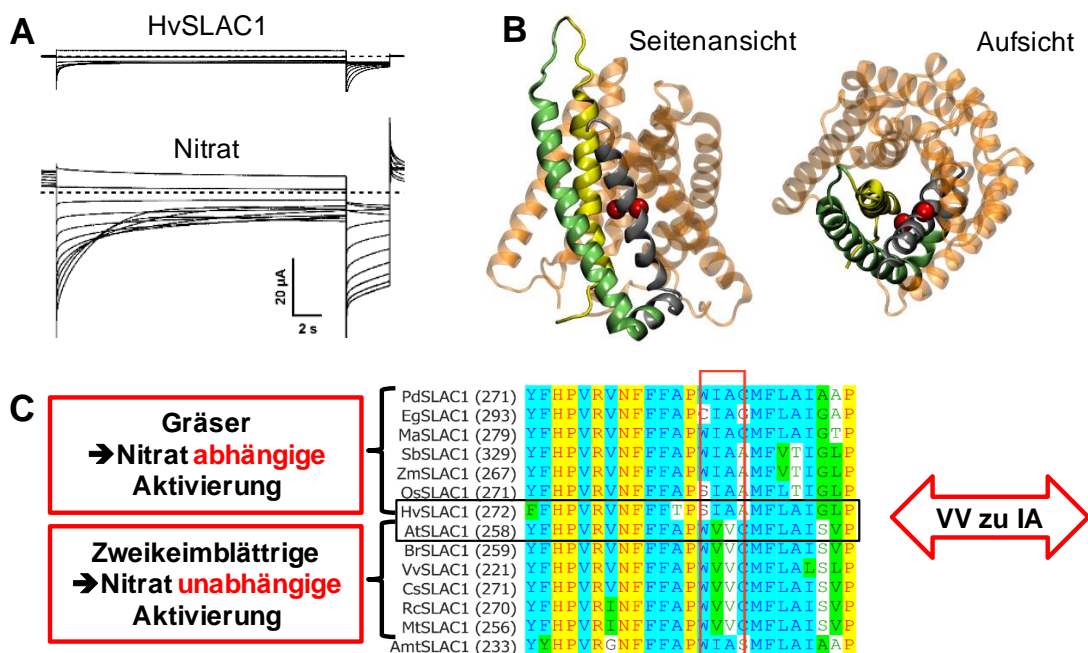


Abbildung 12: Der Schließzell-Anionenkanal der Gerste (HvSLAC1), der zum ABA-induzierten Stomaschluss führt, schaltet nitratabhängig. (A) HvSLAC1 alleine ist inaktiv (oben) und benötigt Nitrat zur Aktivierung. (B) Zwei Aminosäuremotive (rot) entscheiden über diese Eigenschaft. (C) Sequenzvergleiche identifizierten hierfür entweder VV, (NO_3^- -unabhängig), oder IA (NO_3^- -abhängig).

Der nächste Schritt war nun, herauszufinden, wann der Nitratsensor in den SLAC1 Anionenkanälen während der Evolution der Landpflanzen zuerst auftrat. Dazu haben wir einen phylogenetischen Stammbaum mit allen uns zur Verfügung stehenden SLAC1-Sequenzen er-

4.7 Arbeitspaket 7: Freilandversuch – Screening nach Stomaphänotypen

In diesem Projektteil galt es, im Freilandversuch mittels des Rollgewächshauses der LfL aus der vorhandenen Gerstenkollektion die Sorten zu identifizieren, die besonders gut oder schlecht an Trockenstress angepasst sind. Die Pflanzen wurden sowohl unter optimaler Bewässerung als auch unter Trockenstressbedingungen kultiviert. Für das Projekt wurde eine Kollektion von ca. 100 Gerstenlinien zusammengestellt, die vorrangig nach unterschiedlichem Verhalten gegenüber Trockenstress ausgewählt wurden. Dieser Pool setzt sich in erster Linie aus mediterranen, zentraleuropäischen sowie aktuellen Zuchtlinien der beteiligten Züchter zusammen. Zahlreiche Linien stammen aus dem BMBF geförderten Vorprojekt CLIMATE CHANGE. Für das Freilandexperiment wurden von der LfL 59 Kultivare vorselektiert. Zum Zeitpunkt der Antragstellung war geplant, im ersten Jahr (2016) die verschiedenen Genotypen im Freiland mittels des Rollgewächshauses der LfL zu untersuchen. Dieses Experiment musste allerdings wegen terminlicher Probleme auf das zweite Projektjahr (2017) verschoben werden. Stattdessen wurde im ersten Projektjahr in Erlangen bei der AG Sonnenwald ein Gewächshausversuch durchgeführt. Hierbei sollte im Vorfeld geprüft werden, ob für den Freilandversuch mit einem Porometer die stomatare Leitfähigkeit der einzelnen Genotypen als Maß für die Stomaöffnungsweite gemessen werden kann. Diese Messmethodik lässt einen hohen Durchsatz zu und sollte die Linien aufzeigen, deren Stomata am „besten“ und am „schlechtesten“ an Trockenheit und Hitze angepasst sind. Die erzielten Ergebnisse waren allerdings nicht eindeutig. Daher wurde für das Freilandexperiment 2017 ein anderer Ansatz gewählt. Über den Wasser-/Gewichtsverlust abgeschnittener Blätter wurde ermittelt, welche der Gerstensorten ihre Stomata bei Stress besonders gut oder schlecht schließen können (**Abbildung 14**). Dabei fielen drei Gruppen auf:

1. Pflanzen mit guter Trockenstressanpassung verloren unter optimalen Bedingungen viel Wasser, was sehr weit offene Stomata, damit verbunden hohe CO₂-Aufnahme und folglich starkes Wachstum bedeutet. Unter Wassermangel schlossen diese Pflanzen ihre Stomata und schützten sich damit vor Welke (grün umrahmt).
2. Pflanzen mit besonders schlechter Trockenstressanpassung verloren unter optimalen Bedingungen weniger Wasser als unter Trockenstress, was weder gutem Wachstum noch dem Welkeschutz zuträglich war (rot umrahmt).
3. Pflanzen ohne Trockenstressanpassung verloren unter beiden Bedingungen gleich viel Wasser (blau umrahmt).

Von diesen Gruppen haben wir jeweils mehrere Kultivare für den Vergleich mit „Barke“ ausgewählt. Shakira, Strg.654/14 und Arg.DH168 (Gruppe 1, gut angepasst), Flagship und Marne (Gruppe 2, schlecht angepasst). Aus Gruppe 3 B3254 (immer hoher Wasserverlust) sowie 13/594/74 und Morex (immer niedriger Wasserverlust).

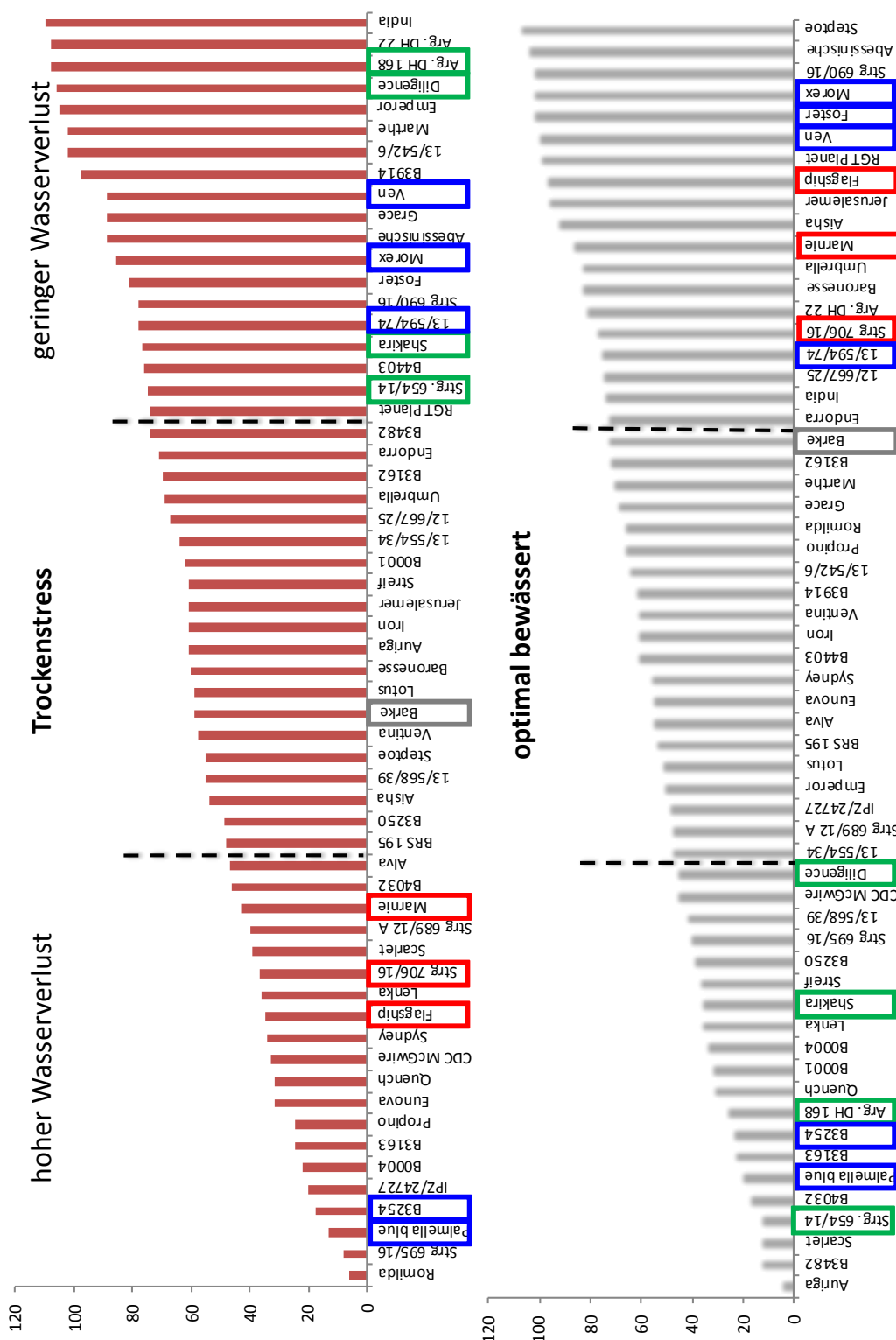


Abbildung 14: Identifizierung von Wassersparern und Wasserverschwendern. Von jedem Kultivar wurden an 2 Tagen Blätter abgeschnitten und der Wasserverlust bezogen auf Trockengewicht und Blattfläche als Funktion der Stomaöffnungsweite bestimmt. Die Tagesdaten für Trockenstress und Optimalbewässerung wurden mit je 1 - 59 gewichtet und für beide Tage addiert. Kultivare mit kleinen Zahlen haben demnach an beiden Tagen viel, Kultivare mit hohen Zahlen wenig Wasser verloren. Grün umrahmt sind Wassersparer unter Trockenstress, rot sind Wasserverschwender, blau reagierten nicht auf Trockenheit.

4.8 Arbeitspaket 8: Validierung der aus dem Freilandversuch hervorgegangenen Linien unter Laborbedingungen

Die Bestimmung des Wasserverlust von Blättern verschiedener Linien beim Freilandexperiment Ende Mai 2017 fand wetterbedingt unter nicht-optimalen Bedingungen statt. Es herrschten für den Mai außergewöhnlich hohe Temperaturen bis weit über 30°C im Feld. Damit hatten zwei zum Teil gegenläufige Parameter, Trocken- und Hitzestress, Einfluss auf die Messungen, die dadurch, vor allem im Vergleich von Nachmittag und Vormittag, nicht immer zu gleichen Ergebnissen geführt haben. Wir haben dennoch die jeweils besten und schlechtesten Wassersparer ausgesucht und unter Laborbedingungen den Versuch wiederholt. Die verschiedenen Linien wurden wie beim Freilandexperiment entweder unter Trockenstress (Minimalbewässerung) oder unter optimaler Wasserversorgung (normale Bewässerung) gehalten und der Blatt-Wasserverlust über die Zeit ermittelt (**Abbildung 15**).

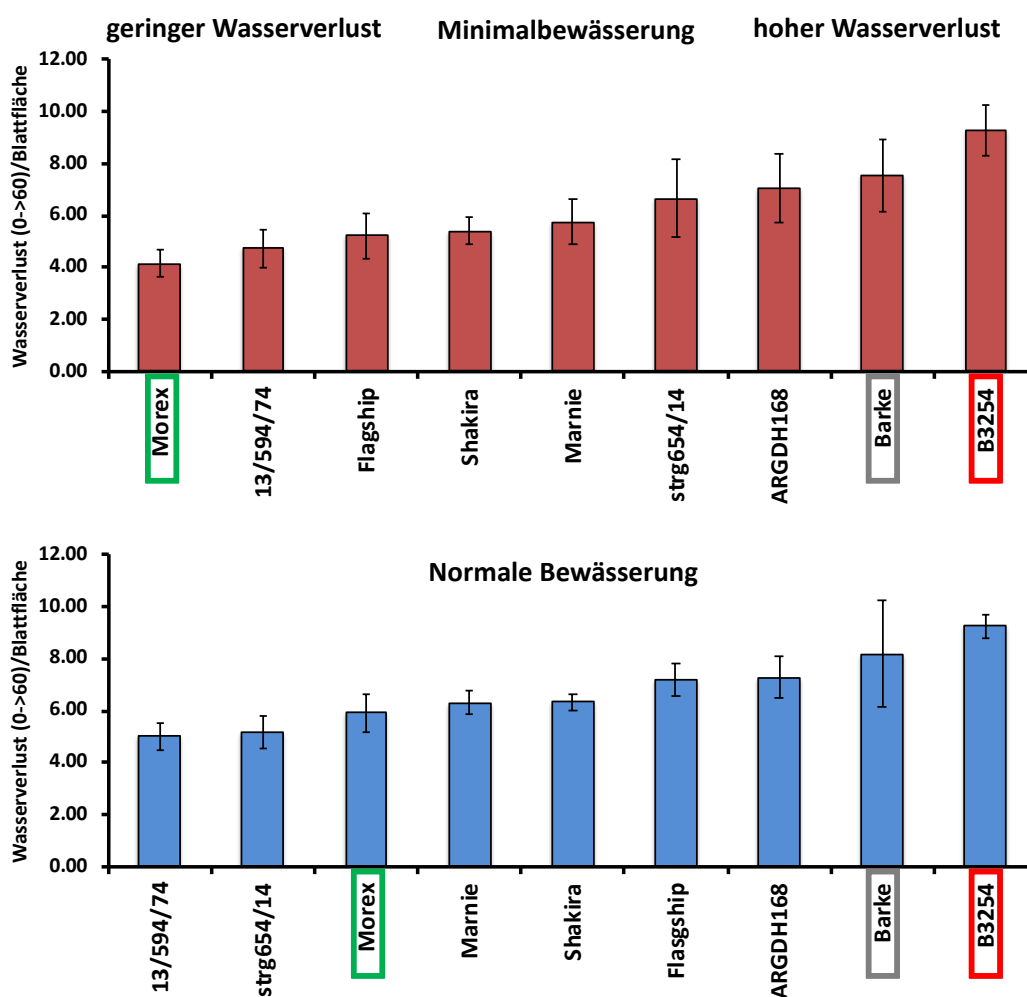


Abbildung 15: Validierung der Gerstensorten und Auswahl für die RNA-Sequenzierung. Für jede Behandlung (minimal/normale bewässert) und Kultivar wurden 6 Blätter von individuellen Pflanzen abgeschnitten und deren Wasserverlust über einen Zeitraum von 60 Minuten gemessen. Das Experiment wurde zweimal durchgeführt, woraus 12 Replikate pro Kultivar resultierten ($n=12 \pm SE$).

Tendenziell konnten die jeweils schlecht und gut angepassten Kultivare aus dem Freilandexperiment bestätigt werden. Anhand dieser Daten haben wir uns für B3254 als „schlechtes“ und Morex als „gutes“ Kultivar entschieden. Beide verhalten sich annähernd wie im Freilandexperiment. Morex war auch bei einem, von unserem Doktoranden unabhängig in Australien durchgeführten ähnlichen Experiment unter den gut angepassten Sorten zu finden. Zudem ist die hohe Trockentoleranz von Morex bereits belegt[16].

4.9 Arbeitspaket 9: Identifizierung von Markergenen

Letztlich soll herausgefunden werden, wie sich gut und schlecht trockenangepasste Gersensorten auf der transkriptionellen Seite unterscheiden. Dafür wurde mit den drei ausgewählten Kultivaren Morex, B3254 und Barke ein Trockenstressexperiment durchgeführt und von jedem Kultivar über Epidermisstreifen die Stomakomplexe unter Stress- und Kontrollbedingungen präpariert und einer RNA-Sequenzierung unterzogen. Die daraus resultierenden Daten wurden von den Bioinformatikern des Helmholtz-Zentrums München ausgewertet. Da wir bereits aus der ersten RNA-Sequenzierung über die Information verfügen, welche Gene eher in Schließ- und welche in Nebenzellen exprimiert werden, können wir auch die trocken-toleranzrelevanten Transkripte entsprechend zuordnen. Aus diesem Datensatz werden Markergene für Trockentoleranz identifiziert und den Züchtern zum Testen an deren Sorten bereitgestellt.

4.10 Stellungnahme zum Projekterfolg hinsichtlich der formulierten Projektziele

Unsere im Antrag formulierten Projektziele unterteilten sich für das erste Jahr auf 4 Arbeitspakete. Das Paket 1 konnte nicht vollständig bearbeitet werden, da das Rollgewächshaus der LfL nicht, wie ursprünglich geplant, verfügbar war. Wir haben uns daher auf die Pakete 2-4 konzentriert und konnten dabei Fortschritte machen, die ursprünglich für das zweite Jahr geplant waren. Daraus ergab sich folgender Zeitplan bezüglich der Arbeitspakete (AP).

1. Jahr

- Zunächst wurden die geplanten ca. 100 Genotypen, die sich in ihrer Stresstoleranz unterscheiden, zusammengestellt (AP1).
- Eine Bestandsaufnahme der funktionellen Eigenschaften des Stoma-/Nebenzellkomplexes der Referenzgerste wurde durchgeführt (AP2).
- Die Stomakomplexe der Referenzlinie wurden funktionell mittels Gaswechsel analysiert (funktionelles Profiling) (AP2).
- Bisherige Erkenntnisse von Arabidopsis wurden auf die Gerste übertragen, orthologe Gene wurden im Gerstengenom gesucht und anschließend in der Referenzgerste validiert (AP2 und 4).
- Die Stomakomplexe der Referenzlinie wurden transkriptionell mittels RNAseq charakterisiert (AP3)
- Aus den RNAseq-Daten wurden schließzellrelevante Transporter identifiziert, kloniert und funktionell charakterisiert (AP4)

Die Ergebnisse aus dem ersten Jahr und teilweise aus dem zweiten konnten wir beim hochrangigen Journal „Current Biology“ publizieren [17]. Unsere Projektziele unterteilten sich für das zweite Jahr auf 5 Arbeitspakete. Wir konnten dabei große Fortschritte machen, die unsere Planung für das dritte Jahr beeinflusst haben. Daraus ergab sich folgender Zeitplan bezüglich der Arbeitspakete (AP).

2. Jahr

- Zunächst wurde die Physiologie des Stomaschlusses der Gerste bezüglich der Schließ- und Nebenzellen detailliert untersucht (AP1).
- RNA-Sequenzierung von Gerstenschließ- und Nebenzellen führte zur Identifizierung stressassoziierter Schließzell-Signalkettenkomponenten und -Schlüsselgene (AP2).
- Gaswechsellmessungen an der Referenzsorte „Barke“ haben eine Nitrat-Abhängigkeit des ABA-induzierten Stomaschluss aufgedeckt (AP3).
- HvSLAC1, der für den Stomaschluss entscheidende Anionentransporter der Gerste, wurde kloniert und seine Funktion sowie seine Evolution analysiert (AP4).
- Aus den 100 Genotypen wurden im Feld die am besten und am wenigsten hitze-/trockenstresstoleranten durch ein Screening der stomatären Leitfähigkeit identifiziert (AP5).

Im dritten Projektjahr (2018) haben wir uns vornehmlich um die verschiedenen Transkriptomanalysen gekümmert. Dabei traten verschiedene Schwierigkeiten auf, durch die einige abschließende Arbeitspakete nach 2019 verschoben werden mussten. Zum einen ließ sich die ABA/GABA-Applikation durch Besprühen der Blätter nicht direkt von Arabidopsis auf die Gerste übertragen, was verschiedene Optimierungsschritte erforderlich machte. Zum anderen gestaltete sich auch die Validierung der Ergebnisse des Freilandexperimentes schwierig. Auch hierzu waren verschiedene unvorhergesehene Experimente notwendig. Letztendlich konnten aber alle geplanten RNA-Sequenzierungen im letzten Quartal 2018 durchgeführt werden. Daraus ergab sich folgender aktualisierter Zeitplan bezüglich der Arbeitspakete (AP) fortlaufend für 2018 und 2019.

3. Jahr

- Da sich herausgestellt hat, dass sich die ABA-Antwort der Schließ- und Nebenzellen bei „Barke“ deutlich von der bei Arabidopsis unterscheidet und nach neuen Erkenntnissen auch GABA an diesen Prozessen beteiligt ist, haben wir nach Optimierung der Methodik entsprechende Transkriptomanalysen der Gerstenstomata in die Wege geleitet (AP1).
- Die aus dem Screen hervorgegangenen Linien wurden analysiert und über Trockenstressexperimente unter Laborbedingungen je eine sehr tolerante und sehr sensitive Linie für die weiteren Untersuchungen ausgewählt (AP2).
- Im Laborexperiment wurden 3 Linien (Referenz, tolerant, sensitiv) Trockenstress ausgesetzt, die Schließzell-/Nebenzellen präpariert und deren RNA sequenziert (AP3).
- Die Klonierung weiterer Schließ- und Nebenzelltransporter wurde fortgesetzt (AP4).

Da uns eine kostenneutrale Verlängerung des Programms bis Ende April 2019 bewilligt wurde, ergeben sich für diesen Zeitraum noch folgende Ziele.

4. Jahr

- Aus dem funktionellen und dem transkriptionellen Profiling der ABA/GABA-Regulation in Verbindung mit dem der ausgewählten Sorten erfolgt die Vorhersage von Zielgenen, die zur Markerentwicklung geeignet sind (AP5).
- Die klonierten Transporter werden funktionell charakterisiert und in unser Modell des Schließ-/Nebenzellmechanismus integriert (AP6).
- Die Markergen Kandidaten werden an vorhandenen Linien unter verschiedenen Stresssituationen geprüft (AP7).
- Erste Validierungs- und Optimierungsversuche werden gemeinsam mit den bayerischen Züchtern in Angriff genommen (AP8).

4.11 Voraussichtlicher Nutzen und Einordnung der Projektergebnisse mit Bezug zum Klimawandel

2010 brach der Gerstenertrag in Deutschland wegen einer ausgedehnten Dürreperiode und Temperaturen von über 35°C um 8 % verglichen zum Vorjahr ein, in Bayern um 7 % (Proplanta.de). Der Sommer 2018 gehörte in Bayern zu den wärmsten und trockensten seit Beginn der Aufzeichnungen. In allen Bereichen der Landwirtschaft waren, besonders durch die langanhaltende Trockenheit, erhebliche Ernteaufschläge zu beklagen. Die bundesweite Getreideernte 2018 war die niedrigste seit 1994 und fiel im Mittel um nahezu 20% niedriger als in den Vorjahren aus (Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft). Hierbei zeigt sich deutlich, dass die eingesetzten Hochleistungsgetreidesorten keine hohe Trockentoleranz aufweisen. Insgesamt ist zukünftig weltweit mit zunehmenden Wetterextremen zu rechnen, wodurch es zu Engpässen bei der Versorgung mit Lebens- und Futtermitteln kommen kann. Bayern als größtes Gerste-Anbaugebiet Deutschlands wird hiervon besonders hart getroffen. Diese Verluste könnten reduziert werden, wenn besser klimaangepasste Gerstensorten verfügbar wären.

Der Wasserhaushalt aller Pflanzen wird über die Stomaweite gesteuert. Die Grundlage für die markergengestützte Züchtung trockenstresstoleranter Gerstensorten ist ein umfassendes Verständnis der Vorgänge, die besonders unter Trockenheit für die optimale Stomaweite verantwortlich sind. Der Stomakomplex der Gerste verfügt wie der aller Gräser über koordiniert arbeitende Schließ- und Nebenzellen. Die Steuerung dieses Stoma-Apparates, die anders als bei den gut untersuchten Schließzellen von z.B. der Modellpflanze Arabidopsis erfolgt, war bislang kaum erforscht. Hier haben wir große Fortschritte erzielt und ein Modell für den Pendelverkehr zwischen Schließ- und Nebenzellen entwickelt. In diesem Zusammenhang konnten wichtige Erkenntnisse zur hormonellen Steuerung (ABA/GABA) dieser Vorgänge erlangt werden. Mit diesem Hintergrund wird der transkriptionelle Vergleich gut und schlecht angepasster Gerstensorten den Züchtern Werkzeuge für die Identifizierung genetischer Merkmale der Trockentoleranz liefern können. Zusammengefasst wurde durch die Fokussierung auf stressrelevante schließzellspezifische Prozesse eine solide wissenschaftliche Grundlage für die markergestützte Selektion klimaangepasster stomaoptimierter Gerstensorten gelegt. Dies dient zum einen der bayerischen Gerstenzüchtung/Landwirtschaft und zum anderen dem verbesserten molekularen Verständnis der Vererbung von Stressantworten in

Gerste. Dabei sollte hervorgehoben werden, dass der hier gewählte Weg zur Verbesserung der Trockentoleranz der Gerste ganz ohne gentechnische Veränderungen des Erbguts auskommt.

5 Veröffentlichungen

Zu Beginn der Förderphase wurde das Projekt in einer Pressemitteilung der Uni-Würzburg vorgestellt:

<https://www.biologie.uni-wuerzburg.de/aktuelles/aktuellesarchiv/single-meldungen/news/pflanzen-fuer-den-klimawandel-fit-machen-1/>

Die ersten Ergebnisse aus dem Projekt haben wir in dem Fachjournal „Current Biology“ publiziert:

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: 1370-1379

In der gleichen Ausgabe von Current Biology gab es auch noch eine Besprechung unseres Artikels:

Brownlee C (2018) Stomatal Physiology: Cereal Successes. *Current Biology* 28: R551-R553

Zu unserer Publikation gab es ebenfalls eine Pressemitteilung der Uni-Würzburg:

<https://www.biologie.uni-wuerzburg.de/aktuelles/aktuellesarchiv/single-meldungen/news/warum-getreide-besser-ist-3/>

Zwei weitere Publikation sind geplant. Eine beschäftigt sich mit dem Pendelverkehr zwischen Schließ- und Nebenzellen der Gerste. Diese Arbeit basiert auf den RNAseq-Daten der kompletten Stomakomplexe und der angereicherten Schließzellen und wird grundlegende Erkenntnisse zur Stomaphysiologie von Gräsern liefern. Die zweite Publikation wird sich aus den Transkriptomdaten der verschiedenen Gerstensorten unter Trockenstress ergeben.

Bei den verschiedenen Symposien des Klimafit-Verbundes wurden jeweils ein Poster und die Ergebnisse in Form eines Vortrags präsentiert.

6 Vernetzungen zu weiteren Verbundpartnern

- Prof. Dr. Uwe Sonnewald (Universität Erlangen), gemeinsame Experimente bezüglich der Stressantwort verschiedener Gerstenlinien.
- Dr. Markus Herz und Dr. Günther Schweizer (Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft, Freising) gemeinsame Experimente mit dem Rollgewächshaus.

- Helmholtz Zentrum München, PGSB, Auswertung aller RNAseq-Experimente
- Prof. Dr. Ralph Hückelhoven, (Universität München), gemeinsame Stressexperimente.

7 Bestehende und entstandene Industriebeteiligung

Von den folgenden Züchtern wurde ein Großteil des verwendeten Saatgutes zur Verfügung gestellt. Sie waren in die Freilandexperimente eingebunden und sollen am Ende die Markergene testen und verifizieren:

- Saatzucht Josef Breun GmbH & Co. KG, Amselweg 1, D-91074 Herzogenaurach, verantwortliche Wissenschaftler: Dr. Anja Hanemann und Dr. Jens Weyen
- Ackermann Saatzucht GmbH & Co. KG Marienhofstrasse 13, D-94342 Irlbach, verantwortlicher Züchtleiter: Dr. Claus Einfeldt
- Saatzucht Streng-Engelen GmbH & Co. KG, Aspachhof, 97215 Uffenheim, verantwortliche Züchtleiter: Dr. Stefan Streng, Peter Greif

8 Zusammenfassung

In diesem Projekt sollten zum einen grundlegende Erkenntnisse zur Stomaregulation der Gerste gewonnen werden. Über Trockenstressexperimente an besonders gut bzw. besonders schlecht an Trockenstress angepassten Gerstensorten sollten Markergene identifiziert werden, die den Züchtern bei der Suche nach trockenoleranten Sorten helfen. Im ersten Schritt wurden dazu an der Gerste-Referenzlinie „Barke“ die Stomata funktionell charakterisiert und dabei festgestellt, dass die Stomabewegung im Vergleich mit Arabidopsis sehr viel schneller abläuft. Dies konnte darauf zurückgeführt werden, dass Gerste, wie alle Gräser, über einen Komplex aus Schließ- und Nebenzellen verfügt. Die Untersuchungen haben gezeigt, dass beim Stomaschluss die Schließzellen schrumpfen, während zeitgleich die Nebenzellen anschwellen und auf die Schließzellen Druck ausüben. Bei der Stomaöffnung verhält es sich genau gegenläufig. Durch dieses Zusammenspiel wird die Stomabewegung stark beschleunigt. Im nächsten Schritt haben wir die Gene identifiziert, welche speziell in Schließ- oder in Nebenzellen exprimieren. Dabei fiel auf, dass, obwohl die beiden Zelltypen eine funktionelle Einheit bilden, nahezu alle mit dem ABA-Signalweg verknüpften Gene ausschließlich in den Schließzellen zu finden waren. Wichtige Kandidaten wurden daraufhin funktionell charakterisiert. Zeitgleich wurde der ABA-induzierte Stomaschluss im Gaswechsel untersucht. Dabei zeigte sich, dass dafür die Anwesenheit von Nitrat unabdingbar ist. Passend dazu ist auch der dafür hauptverantwortliche Anionenkanal HvSLAC1 erst bei Anwesenheit von Nitrat aktiv, eine Eigenschaft, die evolutionär erstmals bei der Aufspaltung von monokotylen und dikotylen Pflanzen auftritt und für alle Monokotyledonen, zu denen auch die Gräser gehören, zutreffen scheint. Letztlich konnten wir ein erstes Modell zur Natur und Regulation des Pendelverkehrs von Ionen und Wasser zwischen Schließ- und Nebenzellen aufstellen. Die-

ses Modell galt es nun unter Trockenstress zu testen und mit Zuchtlinien zu verifizieren. Mit Hilfe der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft, der Arbeitsgruppe Sonnewald und verschiedener Züchter wurden im Feldversuch mit unterschiedlichen Zuchtlinien besonders trockenstresstolerante und -sensitive Linien aufgespürt. In der Folge haben wir deren Stomata-Funktion sowie die Schließzell-/Nebenzell-Genexpression analysiert. Für den Vergleich der sensitivsten und tolerantesten Linien mit der Referenz haben wir die Pflanzen kontrolliertem Trockenstress unter Laborbedingungen ausgesetzt, und Schließ-/Nebenzellproben generiert, die einer RNA-Sequenzierung unterzogen wurden. Parallel dazu wurden „Barke“-Blätter mit ABA und GABA, dass nach unseren aktuellen Erkenntnissen mit ABA im Zusammenhang steht, behandelt und ebenfalls Proben für die Sequenzierung fertig gestellt. Aus diesen beiden Datensätzen sollen bis zum Ende des Förderzeitraums potenzielle Markergene für Trockentoleranz festgemacht und den Bayerischen Züchtern zur Prüfung bereitgestellt werden.

9 Ausblick

In den vergangenen 2 Jahrzehnten wurden die meisten Erkenntnisse zum Wassermanagement der Pflanzen über Untersuchungen am Modellsystem *Arabidopsis thaliana* erlangt. So konnten viele Signalwege aufgeklärt werden, die für negative Einflüsse durch die verschiedensten Stresssituationen verantwortlich sind. Allerdings sind nicht alle dieser Mechanismen direkt auf andere Pflanzen übertragbar, da *Arabidopsis* unter anderem sensitiv gegenüber nahezu jedem Stress ist. Daher ist es dringend erforderlich, Pflanzen, die Toleranz gegenüber Stressfaktoren aufweisen, vergleichend zu *Arabidopsis* zu untersuchen. Besonderes Augenmerk liegt hierbei darauf, unsere Kulturpflanzen an veränderte Umweltbedingungen anzupassen und dabei auf gentechnische Eingriffe zu verzichten. Hierzu sollten im Projektverbund BayKlimaFit Lösungsansätze erarbeitet werden.

Die in diesem Projekt gewonnenen Erkenntnisse tragen maßgeblich zum Verständnis der Stomaphysiologie der Gerste und generell aller Gräser bei, zu denen ein Großteil der heutigen Nutzpflanzen auch in Bayern gehören. Die Evolution hat hier mit der Erweiterung stomatärer Komplexe um die Nebenzellen zu einem Stomatyp geführt, der schneller als Stomata ohne diese Hilfszellen auf Umweltreize reagieren kann und damit prädestiniert für ein optimiertes Wassermanagement ist. Mit dem Projekt wurde der Grundstein gelegt, die zugrundeliegende Physiologie besser zu verstehen. Die zukünftige Forschung wird sich speziell mit den Transportvorgängen zwischen Schließ- und Nebenzellen und deren Regulation beschäftigen. In diesem Bereich werden auch die Markergene vermutet, die entscheidend an der Trockentoleranz von Gräsern beteiligt sind. Wir sind zuversichtlich, dass unsere Projektergebnisse dazu beitragen können, dass Züchter anhand solcher Marker in Zukunft einfacher als bisher trockenresistente Sorten identifizieren werden und diese erfolgreich in Sorten mit anderen positiven Eigenschaften einkreuzen können.

Literaturverzeichnis

- [1] Demir F, Horntrich C, Blachutzik JO, Scherzer S, Reinders Y, Kierszniowska S, Schulze WX, Harms GS, Hedrich R, Geiger D, Kreuzer I (2013): Arabidopsis nanodomain-delimited ABA signaling pathway regulates the anion channel SLAH3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: 8296-8301
- [2] Geiger D, Scherzer S, Mumm P, Stange A, Marten I, Bauer H, Ache P, Matschi S, Liese A, Al-Rasheid KAS, 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: 21425-21430
- [3] 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 Ca^{2+} affinities. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 8023-8028
- [4] 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: ra32
- [5] 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: 372-382
- [6] Maierhofer T, Diekmann M, Offenborn JN, Lind C, Bauer H, Hashimoto K, Al-Rasheid KAS, Luan S, Kudla J, Geiger D, Hedrich R (2014): Site- and kinase-specific phosphorylation-mediated activation of SLAC1, a guard cell anion channel stimulated by abscisic acid. *Sci Signal* 7: ra86
- [7] Meyer S, Mumm P, Imes D, Endler A, Weder B, Al-Rasheid KAS, Geiger D, Marten I, Martinoia E, Hedrich R (2010): AtALMT12 represents an R-type anion channel required for stomatal movement in Arabidopsis guard cells. *Plant J* 63: 1054-1062
- [8] Scherzer S, Bohm J, Krol E, Shabala L, Kreuzer I, Larisch C, Bemm F, Al-Rasheid KA, Shabala S, Rennenberg H, Neher E, Hedrich R (2015): Calcium sensor kinase activates potassium uptake systems in gland cells of Venus flytraps. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112: 7309-7314
- [9] 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. *Current Biology* 23: 53-57
- [10] Bauer H, Ache P, Wohlfart F, Al-Rasheid KAS, Sonnewald S, Sonnewald U, Kneitz S, Hetherington AM, Hedrich R (2013): How do stomata sense reductions in atmospheric relative humidity? *Mol Plant* 6: 1703-1706

- [11] Buchsenschutz K, Marten I, Becker D, Philippar K, Ache P, Hedrich R (2005): Differential expression of K^+ channels between guard cells and subsidiary cells within the maize stomatal complex. *Planta* 222: 968-976
- [12] Koers S, Guzel-Deger A, Marten I, Roelfsema MR (2011): Barley mildew and its elicitor chitosan promote closed stomata by stimulating guard-cell S-type anion channels. *Plant J* 68: 670-680
- [13] Mumm P, Wolf T, Fromm J, Roelfsema MR, Marten I (2011): Cell type-specific regulation of ion channels within the maize stomatal complex. *Plant Cell Physiol* 52: 1365-1375
- [14] Muller HM, Schafer 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* 216:150-162
- [15] Guzel Deger A, Scherzer S, Nuhkat M, Kedzierska J, Kollist H, Brosche M, Unyayar S, Boudsocq M, Hedrich R, Roelfsema MR (2015): Guard cell SLAC1-type anion channels mediate flagellin-induced stomatal closure. *New Phytol* 208:162-173
- [16] Hartmann A, Czauderna T, Hoffmann R, Stein N, Schreiber F (2011): HTPPheno: an image analysis pipeline for high-throughput plant phenotyping. *BMC Bioinformatics* 12:148-156
- [17] Schafer 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* 28:1370-1379

Abkürzungsverzeichnis

A ⁻	Anionen
ABA	Abszisinsäure
AP	Arbeitspaket
CO ₂	Kohlendioxid
EDXA	Energiedispersive Röntgenspektroskopie
GABA	Gamma-Aminobuttersäure
GC	engl. guard cell für Schließzelle
H ₂ O	Wasser
H ⁺	Protonen
Hv	<i>Hordeum vulgare</i>
IRGA	Infrarot Gasanalys
K ⁺	Kaliumionen
KNO ₃	Kaliumnitrat
LfL	Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft
µA	Mikroampere
mM	Millimolar
ms	Millisekunden
NO ₃ ⁻	Nitrat
NZ	Nebenzellen
qPCR	Quantitative Polymerasekettenreaktion
RNA	Ribonucleic acid = Ribonukleinsäure
RNAseq	RNA-Sequenzierung
SZ	Schließzellen
TEVC	engl. Two electrode voltage clamp für 2-Elektroden-Spannungsklemme
<u>Gennamen:</u>	
AKT	<i>Arabidopsis</i> K ⁺ -Transporter
AMT	Ammonia Transporter
CPK/CIPK	Calcium abhängige Proteinkinasen
GORK	Guard Cell Outward Rectifying K ⁺ -Channel
HKT	High Affinity K ⁺ -Transporter
NRT	Nitrate Transporter
PYR/PYL/RCAR	ABA-Rezeptoren
OST	Open stomata
PP2C/HAB1	Proteinphosphatase Typ 2C
SLAC	Schließzellanionenkanal
SLAH	SLAC-Homolg
STP	Sugar Transporter
SUT	Sucrose Transporter
TPK	Two-Pore K ⁺ -Channel