

# **Der Einfluss von elektrischen Signalen auf Anatomie und Physiologie ausgewählter Pflanzenarten**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades  
Doktor rerum naturalis (Dr. rer. nat.)

an der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften im Fachbereich  
Biologie der Universität Hamburg

Jasmin Carolin Vuralhan-Eckert  
aus Goslar

Hamburg, April 2019



---

## Prüfungskommission

---

Tag der Disputation 04. Juli 2019.

Folgende Gutachter empfehlen die Annahme der Dissertation:

**Erstgutachter:**

Prof. Dr. Jörg Fromm  
Universität Hamburg  
Institut für Holzwissenschaften  
Abteilung Holzbiologie  
Leuschnerstraße 91d  
21031 Hamburg

**Zweitgutachter:**

Prof. Dr. Kai Jensen  
Universität Hamburg  
Institut für Pflanzenwissenschaften und Mikrobiologie  
Angewandte Pflanzenökologie  
Ohnhorststr. 18  
22609 Hamburg

**Prüfungskommission:**

Prof. Dr. Jörg Fromm  
Prof. Dr. Kai Jensen  
Prof. Dr. Michael Köhl  
Prof. Dr. Dieter Hanelt





---

## Eidesstattliche Versicherung

---

Hiermit erkläre ich, Jasmin Vuralhan-Eckert, an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift mit dem Titel: „Der Einfluss von elektrischen Signalen auf Anatomie und Physiologie ausgewählter Pflanzenarten“, selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen benutzt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Arbeiten anderer entnommen sind, habe ich als entnommen kenntlich gemacht. Die Arbeit hat mit gleichem bzw. in wesentlichen Teilen gleichem Inhalt noch keiner Prüfungsbehörde vorgelegen und ich versichere, dass diese Dissertationsschrift nicht in einem früheren Promotionsverfahren eingereicht wurde. Die eingereichte schriftliche Fassung entspricht der auf dem elektronischen Speichermedium.

Hamburg, 25. April 2019

---

Jasmin Vuralhan-Eckert



*„Es kommt nicht darauf an, mit dem Kopf durch die Wand zu rennen, sondern mit den  
Augen die Tür zu finden.“*

*Werner von Siemens (\*1816 – †1892)*



---

## Danksagung

---

Herrn Professor Dr. Fromm danke ich für die Möglichkeit meine Dissertation in seiner Arbeitsgruppe am Institut für Holzbiologie anfertigen zu können und für die Übernahme des Hauptreferates. Nur durch Sie ist diese Arbeit möglich gewesen. Einen herzlichen Dank für Ihre Unterstützung und Förderung meine Fähigkeiten weiter zu entwickeln.

Weiterer Dank geht an Herrn Prof. Dr. Jensen für die Übernahme des Korreferates.

Herrn Prof. Dr. Hanelt danke ich für sein Engagement und für die hilfreichen Hinweise zu meiner Arbeit.

Ein besonderer Dank geht an unsere ehemalige technische Assistentin Gabriele Lütje für Ihre herzliche Art, ein stets offenes Ohr, ermutigende Worte und tatkräftige Unterstützung. Zusätzlich möchte ich Silke Lautner, Katharina Erdt, Sabine Kruse, Silas Lau, Helena Burkhardt und Thomas Schwarz für ihre wertvolle Hilfe danken. Sebastian Glasenapp danke ich für die rettende Idee mit den Konfidenzniveaus. Ebenso gebührt Dank Daniela Nissen und Regina Schröter. Sie haben alle Probleme ob kleinerer und/oder größerer Natur beseitigt.

Für die fürsorgliche Versorgung der Versuchspflanzen danke ich den Gärtnern, im Besonderen Willi Goosen, dem es so manches Mal schwer fiel sich die Trockenstressexperimente anzuschauen.

Zusätzlich möchte ich dem gesamten Zentrum für Holzwirtschaft für die allseits fachlich kompetente und freundliche Unterstützung danken. Auch wenn man „extern“ ist, wird man freundlich aufgenommen.

Dr. Ralf Gente und Herrn Prof Dr. Koch danke ich für die Betreuung und Möglichkeit, Terahertzmessungen in Marburg durchzuführen.

Natürlich gab es auch privat Menschen, die mich unterstützt und durch konstruktive Kritik durch Frustrationsphasen begleitet haben. Ich kann sagen, dass ich nach der Promotionszeit meine Lieben noch mehr zu schätzen weiß. In diesem Sinne geht ein besonderer Dank an Christine, die mein Gewissen auf der Schulter war und mich immer neu motiviert hat, ob zum Sport oder zum Schreiben. Die Suche nach Rechtschreibfehlern und das Plädieren fürs Präsens waren dabei ihr liebstes Hobby. An Miri, die trotz der Entfernung alle Höhen und Tiefen gemeinsam mit mir erlebt hat und natürlich an Eybe, der mit mir jeden Weg geht und dabei mein Rückenwind ist. Meiner „alten“ und „neuen“ angeheirateten Familie danke ich dafür, dass sie mich stets in meinem Vorhaben bestärkt und immer versucht haben zu verstehen, was ich eigentlich tue.

Sollte ich jemanden vergessen haben, dann war dies keine böse Absicht, denn bei einer Dissertation ist man/frau auf das Know-how anderer angewiesen.

---

## Zusammenfassung

---

Die elektrische Signalweiterleitung ist ein zentrales Element der pflanzlichen Anpassung auf eine sich verändernde Umwelt oder auftretende Stressfaktoren. Dafür finden sowohl langsamere Variations- als auch schnellere Aktionspotentiale Verwendung.

Für die Analyse des Einflusses elektrischer Signale auf mikroskopischer und makroskopischer Ebene wurde im ersten Teil dieser Arbeit ein sogenannter Rotationsversuch durchgeführt. Dabei wurden unterschiedliche Arten verholzender  $C_3$  (*Mimosa pudica* und *Acer pseudoplatanus*) und nicht verholzender  $C_4$  (*Zea mays*) Photosynthese betreibender Pflanzen untersucht. Diese wurden mehrmals täglich für 15 Minuten rotiert. Es wurde beobachtet, dass die physiologischen Veränderungen dem Reiz der Thigmomorphogenese mit vermindertem Wuchs entsprachen und während der Rotation waren elektrische Signale messbar. Das rotierte Gewebe zeigte einen geringeren Stickstoffgehalt. Zusätzlich war durch die Rotation eine Reizadaptation bei den *Mimosa pudica* Pflanzen zu beobachten.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde das Thema der Signalverarbeitung simultaner unterschiedlicher Stimuli an *Zea mays* ( $C_4$ ) und *Glycin max L.* ( $C_3$ ) näher betrachtet. Diese Getreidearten sind besonders für die Welternährung relevant. Als Reize wurden die Wiederbewässerung nach Trockenstress (bei Bodenwassergehalten von 10 % – 20 %,) der Hitzestimulus sowie beide Stimuli in Kombination betrachtet. Dabei wurden im Besonderen Spurenelement- und Nährstoffzusammensetzungen, physiologische und makro- und mikroskopische Aspekte untersucht sowie Transmissionsmessungen im Terahertz Bereich vorgenommen, um sich ergebende Unterschiede analysieren zu können. Die Transmission zeigte nach Wiederbewässerung zunächst eine Zunahme des Wassergehaltes im Blattgewebe, der darauffolgende Hitzestimulus sorgte für eine kurzzeitige erneute Abnahme. Im Gaswechsel konnten geringe Unterschiede zwischen beiden Spezies beobachtet werden. Zusammenfassend nahm nach dem Hitzestimulus die Netto  $CO_2$  Aufnahmerate, die stomatäre Leitfähigkeit und die Transpirationsrate ab. Im Gegensatz dazu stiegen die zuvor genannten Parameter nach der Wiederbewässerung mit vorangegangenen Trockenstress. Insgesamt erschien die Kombination beider Stimuli im Vergleich zu dem jeweiligen Einzelreiz als Verknüpfung der zuvor beobachteten Antworten der Netto  $CO_2$  Aufnahmerate, stomatären Leitfähigkeit und Transpiration, sodass es zunächst zu einem Rückgang der Parameter

mit anschließendem Anstieg kam. Die intrazelluläre CO<sub>2</sub> Konzentration verlief immer entgegengesetzt. Auf elektrophysiologischer Ebene traten stärkere Unterschiede zwischen *Glycine max L.* und *Zea mays* auf. *Glycine* reagierte sowohl auf die Wiederbewässerung als auch auf den Feuerreiz mit Hyperpolarisation, die sich in Kombination beider Reize verstärkte und zeitlich verlängerte. Bei *Zea* war bei der simultanen Stimulation eine Hyperpolarisation (Hitze stimulus) mit anschließender Depolarisation (Wiederbewässerung) zu beobachten. Die Wachstumsversuche zeigten keine eindeutigen Tendenzen durch die verwendeten Stimuli in den untersuchten Spezies, sodass in Bezug auf die Biomasse und den C/N Gehalt keine deutlichen Unterschiede gefunden wurden. Es traten unterschiedliche Elementkonzentrationen durch die Stimuli auf, dabei war besonders die erhöhte Natriumkonzentration gegenüber der positiven Kontrolle auffällig.



---

## Abstract

---

Electrical signal transmission is a central element of plant adaptation to a changing environment or emerging stress factors. Slower variation as well as faster action potentials occurred in the following cases.

For the analysis of the influence of electrical signals on microscopic and macroscopic levels, in the first part of this work a so-called rotation experiment was performed. Different plant species of lignifying with C<sub>3</sub> photosynthesis, *Mimosa pudica* and *Acer pseudoplatanus*, and non-woody C<sub>4</sub> photosynthesis plant *Zea mays* were investigated. These were rotated several times a day for 15 minutes. It was observed that the physiological changes correspond to the stimulus of thigmomorphogenesis with diminished growth. Electrical signals were measurable during rotation. No changes at the cellular level were detected. The rotated tissue showed a lower nitrogen content. In addition, a stimulus adaptation of the *Mimosa pudica* plants could be observed due to the rotation.

In the second part of this thesis the topic of signal processing of simultaneous different stimuli on *Zea mays* (C<sub>4</sub>) and *Glycine max L.* (C<sub>3</sub>) was analyzed in more detail. These plants are particularly relevant for world nutrition. The following stimuli were used: reirrigation after drought stress (at soil water contents of 10% up to 20%), heat stimulus triggered by a lighter for 3 sec, and both stimuli in combination. In particular, trace element and nutrient compositions, physiological and growth aspects as well as transmission measurements in the terahertz range were carried out in order to be able to analyze the resulting differences. The transmission after reirrigation showed first an increase of the water content in the leaf tissue, the following heating provided for a brief renewed decrease. In the gas exchange small differences between the both species could be observed. In summary, the net CO<sub>2</sub> uptake rate, stomatal conductivity and transpiration rate decreased after the heat stimulus. In contrast, the aforementioned parameters increased after reirrigation with previous drought stress. Overall, the combination of both stimuli in comparison to the respective individual stimuli appeared to be a combination of the previously observed responses of the net CO<sub>2</sub> uptake rate, stomatal conductivity and transpiration, so that initially there was a decrease in the parameters followed by an increase. The intracellular CO<sub>2</sub> concentration showed always a contrary development. On the electrophysiological level

there were stronger differences between *Glycine max L.* and *Zea mays*. *Glycine* responded to both reirrigation as well as heat stimulation with hyperpolarization, which was amplified and prolonged over time in combination of both stimuli. In *Zea*, simultaneous stimulation was accompanied by a hyperpolarization (heat stimulus) with subsequent depolarization (reirrigation). The growth experiments did not show any clear tendencies due to the stimuli used in the studied species, so that in relation to biomass and C/N content no significant differences were found. Different element concentrations occurred due to the stimuli, especially the increased sodium concentration compared to the positive control was conspicuous.

---

# Inhaltsverzeichnis

---

Prüfungskommission	iii
Eidesstattliche Versicherung	v
Danksagung	ix
Zusammenfassung	xi
<i>Abstract</i>	xiii
Inhaltsverzeichnis	xviii
Abbildungsverzeichnis	xix
Tabellenverzeichnis	xxi
Abkürzungsverzeichnis	xxiii
1 Einleitung	1
1.1 Zielsetzung dieser Arbeit . . . . .	1
2 Anatomische und physiologische Grundlagen	5
2.1 Blattaufbau . . . . .	5
2.1.1 Stomata . . . . .	6
2.2 Photosynthese . . . . .	7
2.2.1 C <sub>3</sub> Photosynthese . . . . .	8
2.2.2 C <sub>4</sub> Photosynthese . . . . .	9
2.3 Wasserhaushalt . . . . .	10
2.4 Circadianer Rhythmus . . . . .	12
2.5 Nährstoffe . . . . .	12
2.6 Pflanzenarten und Bedeutung . . . . .	14
2.6.1 <i>Acer pseudoplatanus</i> . . . . .	14

2.6.2	<i>Glycine max L.</i> . . . . .	14
2.6.3	<i>Mimosa pudica</i> . . . . .	15
2.6.4	<i>Zea mays</i> . . . . .	15
2.7	Signalarten und -weiterleitung im pflanzlichen Gewebe . . . . .	15
2.7.1	Elektrische Signalweiterleitung . . . . .	16
2.7.1.1	Aktionspotenziale . . . . .	18
2.7.1.2	Plamodesmen . . . . .	18
2.7.1.3	Variationspotenziale . . . . .	19
2.7.1.4	Hydraulische Signale . . . . .	19
2.8	Transmissionsmessungen . . . . .	20
2.9	Thigmomorphogenese . . . . .	21
3	Material und Methoden . . . . .	23
3.1	Material . . . . .	23
3.1.1	Pflanzenmaterial . . . . .	23
3.1.2	Gewächshaus . . . . .	23
3.1.3	Substrat . . . . .	24
3.1.4	Chemikalien . . . . .	24
3.1.4.1	Medien . . . . .	25
3.1.5	Hardware und Geräte . . . . .	25
3.1.6	Software, Online-Programme und Datenbanken . . . . .	28
3.2	Methoden . . . . .	30
3.2.1	Pflanzenmaterial und Kultivierung . . . . .	30
3.2.2	Rotierende Bewegung der Pflanzen . . . . .	30
3.2.3	Ernte . . . . .	32
3.2.3.1	Darren . . . . .	32
3.2.4	Präparation von pflanzlichem Gewebe . . . . .	32
3.2.4.1	Einbettung der Proben in PEG . . . . .	32
3.2.4.2	Farbstoff Herstellung . . . . .	33
3.2.4.3	Schneiden und Färben von Präparaten . . . . .	33
3.2.4.4	Bildanalyse für Fotografie der Präparate . . . . .	35
3.2.5	Elektrophysiologische Potenzialmessungen von pflanzlichen Geweben . . . . .	36
3.2.5.1	Chlorierung von Silberdraht für extrazelluläre Messungen . . . . .	36
3.2.5.2	Potenzialmessungen extrazellulär . . . . .	37
3.2.5.3	Mikroelektroden Herstellung für intrazelluläre Messungen . . . . .	37
3.2.5.4	Potenzialmessungen intrazellulär . . . . .	37
3.2.6	Temperaturmessungen an der Blattoberfläche . . . . .	38
3.2.7	Gaswechsellmessungen . . . . .	39

3.2.8	Darstellung des Wachstums mittels eines automatisierten Bildgebungsverfahren . . . . .	40
3.2.9	Transmissionsmessungen im Terahertz Bereich . . . . .	43
3.2.10	Elementaranalyse . . . . .	44
3.2.11	Druckaufschluss für das ICP-OES . . . . .	46
3.2.12	Induktiv gekoppeltes Plasma mit optischer Emissionsspektrometrie (ICP-OES) . . . . .	46
3.2.13	Biostatistische Methoden . . . . .	47
3.2.13.1	Durchschnittliche Gefäßgröße und Gefäßanzahl . . . . .	47
3.2.13.2	Prozentualer Wassergehalt . . . . .	47
3.2.14	Mathematische Berechnungen . . . . .	47
3.2.14.1	Arithmetrischer Mittelwert . . . . .	47
3.2.14.2	Standardabweichung . . . . .	48
3.2.14.3	Standardfehler . . . . .	48
3.2.14.4	Normalverteilung . . . . .	48
3.2.14.5	ungepaarter Students t-Test . . . . .	48
3.2.14.6	Konfidenzniveau . . . . .	48
4	Ergebnisse . . . . .	51
4.1	Reaktionen verschiedener Pflanzenarten auf Rotation . . . . .	51
4.1.1	Anatomische Analysen von rotierten <i>Mimosa pudica</i> . . . . .	51
4.1.1.1	C/N Analyse des Pflanzenmaterials der rotierten <i>Mimosa pudica</i> . . . . .	55
4.1.2	Anatomische Analyse von rotiertem <i>Acer pseudoplatanus</i> . . . . .	57
4.1.3	Anatomische Analyse von rotiertem <i>Zea mays</i> . . . . .	62
4.1.3.1	Elektrische Signale in rotiertem <i>Zea mays</i> . . . . .	66
4.1.4	Transmissionsmessungen und Rotation . . . . .	67
4.2	Simultane Stimulation durch mehrere Reize . . . . .	68
4.2.1	THz-Transmissionsmessungen der absoluten Wassermenge in Blättern . . . . .	68
4.2.2	Der Einfluss von Hitzereiz und Wiederbewässerung auf den Gasaustausch von <i>Glycine max L.</i> und <i>Zea mays</i> . . . . .	69
4.2.3	Wassergehaltsbestimmung während des Trockenstresses . . . . .	73
4.2.4	Elektrophysiologische Analyse zur simultanen Reizverarbeitung . . . . .	73
4.2.4.1	Elektrophysiologische Analyse zur simultanen Reizverarbeitung in <i>Glycine max L.</i> . . . . .	74
4.2.4.2	Elektrophysiologische Analyse zur simultanen Reizverarbeitung in <i>Zea mays</i> . . . . .	75
4.2.5	Circadianer Rhythmus . . . . .	77

4.2.6	Temperaturmessungen an der Blattoberfläche beim Hitzestimulus .	78
4.2.7	Status Beschreibung im Python Programm für die Einstellung des Fokus im automatisierten Bildgebungsverfahren . . . . .	79
4.2.8	Wuchsveränderung von <i>Glycine max L.</i> Pflanzen durch unterschiedliche Reize . . . . .	83
4.2.8.1	C/N Analyse von <i>Glycine max L.</i> . . . . .	90
4.2.9	Wuchsveränderung von <i>Zea mays</i> Pflanzen durch unterschiedliche Reize . . . . .	92
4.2.9.1	C/N Analyse von <i>Zea mays</i> . . . . .	95
4.2.9.2	ICP-OES Analyse von <i>Zea mays</i> . . . . .	96
5	Diskussion	99
5.1	Rotationsversuch und der Einfluss der Thigmomorphogenese . . . . .	99
5.2	Mehrfache Stimulation und Einflussfaktoren . . . . .	105
5.2.1	THz-Transmissionsmessungen der absoluten Wassermenge in Blättern	105
5.2.2	Hitzestimulus und seine Auswirkungen . . . . .	106
5.2.3	Wiederbewässerung nach Trockenstress und dessen Folgen . . . . .	109
5.2.4	Kombinierte Reizverarbeitung, wie geht die Pflanze damit um? . .	111
5.2.5	Die Reize und ihr Einfluss auf den Wuchs . . . . .	114
5.2.5.1	Betrachtung der C/N Verschiebung im Gewebe . . . . .	115
5.3	Fazit . . . . .	116
6	Ausblick	119
	Literaturverzeichnis	121
A	Anlagen	133
A.1	Aus der Arbeit hervorgegangene Veröffentlichungen . . . . .	133
A.2	Quellcode dynamischer Fokus bildgebende Einheit . . . . .	133
A.3	Quellcode verändert für statischen Fokus bildgebende Einheit . . . . .	149

---

## Abbildungsverzeichnis

---

1.1	Schematische Darstellung zu den Untersuchungen der Reizverarbeitung . . . . .	2
2.1	Blattaufbau . . . . .	6
2.2	C <sub>3</sub> Photosynthese . . . . .	9
2.3	C <sub>4</sub> Photosynthese . . . . .	10
3.1	Aufbau des Rotationsversuches . . . . .	31
3.2	Messung der Topfhöhen im Rotationsversuch . . . . .	31
3.3	Gefäßvermessung am Beispiel einer <i>Mimosa pudica</i> Kontrollpflanze . . . . .	36
3.4	Beispielhafte Darstellung der Temperaturmessung . . . . .	39
3.5	Schematische Darstellung des Funktionsprinzips des Li-6400 XT . . . . .	40
3.6	Aufbau des Roboterarms und der Kamera . . . . .	42
3.7	Automatisiertes Bildgebungsverfahren . . . . .	43
3.8	Transmissionsmessung an <i>Glycine max L.</i> . . . . .	44
4.1	Ernteparameter der <i>Mimosa pudica</i> 2015 . . . . .	52
4.2	Ernteparameter von <i>Mimosa pudica</i> 2016 . . . . .	54
4.3	Gefäßdichte im Verhältnis zur Gefäßgröße im Stamm von <i>Mimosa pudica</i> . . . . .	55
4.4	C/N Quotient von <i>Mimosa pudica</i> 2015 . . . . .	56
4.5	C/N Quotient von <i>Mimosa pudica</i> 2016 . . . . .	57
4.6	<i>Acer pseudoplatanus</i> im Rotationsversuch . . . . .	58
4.7	Rotationsinduzierte Parameter von <i>Acer pseudoplatanus</i> im Vergleich zu den Kontrollbäumen . . . . .	60
4.8	Ernteparameter von <i>Acer pseudoplatanus</i> . . . . .	61
4.9	Gefäßdichte im Verhältnis zur Gefäßgröße im Stamm von <i>Acer pseudoplatanus</i> Bäumen . . . . .	62
4.10	Wuchsparameter der <i>Zea mays</i> Pflanzen . . . . .	63
4.11	Ernteparameter und Stängeldurchmesser der <i>Zea mays</i> Pflanzen . . . . .	64
4.12	Querschnitt des <i>Zea mays</i> Sprosses . . . . .	65

---

4.13	Verhältnis Gefäßdichte zur Gefäßgröße von <i>Zea mays</i> . . . . .	66
4.14	Messung elektrischer Signale bei der Rotation . . . . .	67
4.15	Transmissionsmessung an <i>Glycine max L.</i> . . . . .	68
4.16	Änderungen des Gaswechsel bei <i>Glycine max L.</i> nach Stimulation der Blattspitze und/oder Wiederbewässerung . . . . .	70
4.17	Änderungen des Gaswechsel bei <i>Zea mays</i> nach Stimulation der Blattspitze und/oder Wiederbewässerung . . . . .	72
4.18	Potenzialmessungen intrazellulär am <i>Glycine max L.</i> Pflanzen . . . . .	74
4.19	Schema des Aufbaus der kombinierten Reize mit intrazellulären und Gas- wechsellmessung an <i>Zea mays</i> . . . . .	75
4.20	Potenzialmessungen intrazellulär an <i>Zea mays</i> . . . . .	76
4.21	Circadianer Rhythmus . . . . .	77
4.22	Temperaturverläufe an <i>Zea mays</i> nach Erhitzung der Blattspitze . . . . .	78
4.23	Darstellung des mittleren Abstandes (9 cm) der gemessenen Temperaturen an <i>Zea mays</i> . . . . .	79
4.24	Optik im Bezug auf Bildschärfe . . . . .	80
4.25	Schema der Fokusprogramme . . . . .	81
4.26	Schema des Aufbaus der kombinierten Reize an <i>Glycine max L.</i> . . . . .	85
4.27	Wuchsbeeinflussung durch die Stimuli . . . . .	86
4.28	Ernteparameter des Reizversuches an <i>Glycine max L.</i> . . . . .	89
4.29	C/N Quotient von <i>Glycine max L.</i> . . . . .	91
4.30	Ernteparameter des Reizversuches von <i>Zea mays</i> . . . . .	95
4.31	C/N Quotient von <i>Zea mays</i> . . . . .	96
4.32	Elementgehalte der ICP-OES von <i>Zea mays</i> Pflanzen . . . . .	97
5.1	Stängel von <i>Zea Mays</i> . . . . .	101



---

## Tabellenverzeichnis

---

2.1	Auslöser pflanzlichen Stresses . . . . .	16
3.1	Verwendete Pflanzenarten . . . . .	23
3.2	Verwendete Chemikalien und Säuren . . . . .	25
3.3	APW Ansatz des Mediums . . . . .	25
3.4	Hardware und Geräte . . . . .	26
3.5	Software und Internet-Programme . . . . .	29
3.6	Verwendete Standards der Elementaranalyse . . . . .	45
4.1	Bestimmung des Wassergehalts . . . . .	73
4.2	Typ des Stimulus mit dem Durchschnitt der Amplitude und Dauer in <i>Zea mays</i>	77
4.3	Prozentuale Veränderungen der Gruppen von <i>Glycine max L.</i> . . . . .	87
4.4	Prozentuale Veränderungen der Gruppen von <i>Zea mays</i> . . . . .	93



---

## Abkürzungsverzeichnis

---

Hier nicht erwähnt, aber in dieser Arbeit verwendet, wurden die Symbole der chemischen Elemente, die von IUPAC-IUB empfohlenen Abkürzungen (Liébecq, 1992), die Standardabkürzungen der SI-Einheiten und die entsprechenden Präfixe sowie im Lexikon Duden verankerte Abkürzungen.

<b>ATP</b>	Adenosintriphosphat
<b>CO<sub>2</sub></b>	Kohlenstoffdioxid
<b>FG</b>	Frischgewicht
<b>H<sub>2</sub>O</b>	Wasser
<b>IRGA</b>	Infrarot Gasanalysator
<b>MES</b>	2-( <i>N</i> -Morpholino)ethansulfonsäure
<b>O<sub>2</sub></b>	molekularer Sauerstoff
<b>PAR</b>	photosynthetisch aktive Radiation
<b>PEG</b>	Polyethylenglycol
<b>pH</b>	pH-Wert, <i>potentia Hydrogenii</i>
<b>ppm</b>	<i>parts per million</i>
<b>rpm</b>	<i>rounds per minute</i>
<b>RubisCO</b>	Ribulose-1,5-bisphosphat-carboxylase/-oxygenase
<b>TG</b>	Trockengewicht
<b>THz</b>	Terahertz
<b>URL</b>	Uniform Resource Locator
<b>USDA</b>	Landwirtschaftsministerium der Vereinigten Staaten



# KAPITEL 1

---

## Einleitung

---

Die Signalweiterleitung ist für Pflanzen essentiell, um auf entwicklungsbedingte Stimuli oder biotische sowie abiotische Stressfaktoren schnell reagieren zu können. Neben den Phytohormonen bilden elektrische Signale einen wesentlichen Bereich bei der Signalweiterleitung.

Das Wissen zur elektrischen Signalweiterleitung im pflanzlichen Gewebe hat sich in den letzten Jahren stark vertieft. Mittlerweile ist bekannt, dass die phloem-mobilen Signale für den Wasserhaushalt, die Photosynthese und die Respiration von Bedeutung sind. Dabei treten sowohl langsamere Variations- als auch schnellere Aktionspotentiale auf. Allerdings bleiben noch viele offene Fragen bestehen, welche besonders das pflanzliche Wachstum und die Signalverarbeitung betreffen. Eine Erforschung dieser ist unabdingbar, um ein Verständnis der Pflanzen als Gesamtbild zu erhalten und langfristig mit dem von der Menschheit vielfältig genutzten Reich der *Plantae* zu leben. An dieser Stelle setzt das Forschungsvorhaben an. Es soll eine Analyse des Einflusses elektrischer Signale auf das Pflanzenwachstum und die Signalverarbeitung liefern.

### 1.1 Zielsetzung dieser Arbeit

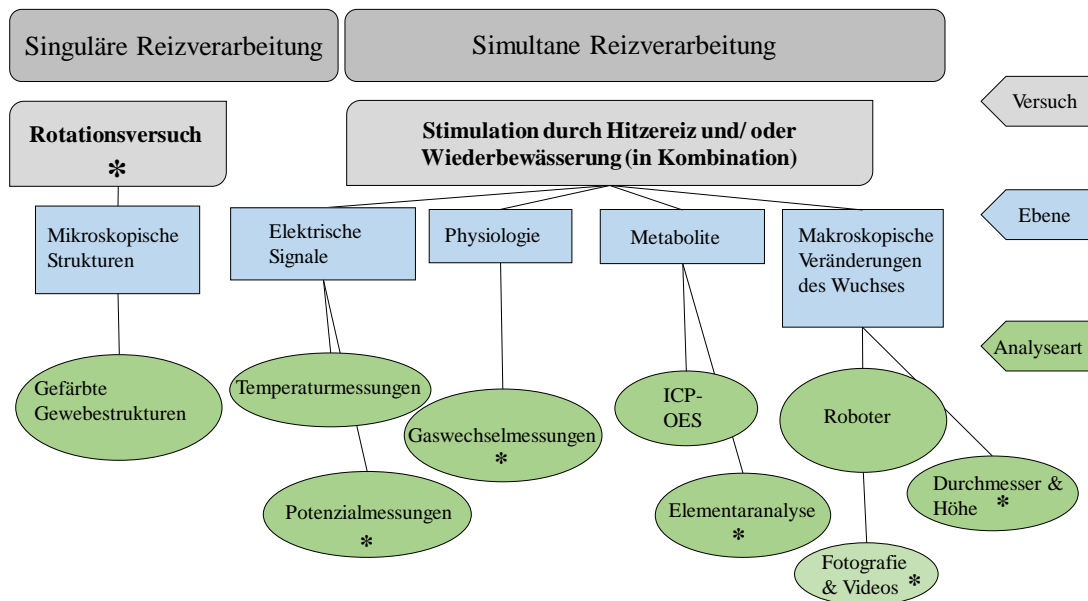
Ziel dieser Arbeit ist, die Kenntnisse zu anatomischen und physiologischen Reaktionen elektrischer Signale zu vertiefen und deren Funktionen zu entschlüsseln.

Die konkreten Ziele gliedern sich in folgende Aspekte:

- Untersuchung des Einflusses der Signale auf physiologischer Ebene  
Es wurde zuvor gezeigt, dass die Photosynthese durch Hitzestimuli beeinflusst werden kann. Eine weitere Untersuchung des Einflusses simultaner, durch Wiederbewässerung und Hitze ausgelöster Reize sollte überprüft werden.

- Überprüfung unterschiedlicher Signaltypen im Zusammenspiel  
Dabei sollten im Besonderen die Messung und Induktion von Variations- und Aktionspotenzialen, während des pflanzlichen Wachstums analysiert werden. Es soll eine Unterscheidung zwischen lokaler und Langstrecken-Signalweiterleitung im pflanzlichen Gewebe stattfinden.
- Betrachtung der Einflüsse auf makro- und mikroskopischer Ebene  
Eine anatomische Untersuchung sollte durch die mikroskopische Betrachtung der zellulären Strukturen nach Einfluss von elektrischen Signalen mittels Mikrotom-Schnitten und Gewebestrukturfärbungen durchgeführt werden.
- Analyse von relevanten Metaboliten der Signalweiterleitung  
Auf biochemischer Ebene sollte eine quantitative Analyse von Metaboliten und Ionen erfolgen, um Aufschlüsse über die stoffwechselphysiologische Bedeutung der Signalweiterleitung zu erlangen.

In Abbildung 1.1 sind die jeweiligen Experimentblöcke zusammenfassend mit der Idee des Versuches, Funktion und Analyseart dargestellt.



**Abbildung 1.1: Schematische Darstellung zu den Untersuchungen der Reizverarbeitung.** In der ersten Ebene ist der Versuch dargestellt. In der zweiten Ebene auf welchem Level dieser untersucht werden sollte. In der letzten Ebene die dafür verwendete Analyseart. Mit \* sind Analysearten gekennzeichnet, die ebenso im Rotationsversuch Verwendung fanden.

Für die Analyse des Einflusses elektrischer Signale auf mikroskopischer und makroskopischer Ebene werden im ersten Teil dieser Arbeit ein sogenannter Rotationsversuch durchgeführt. Dabei werden unterschiedliche Arten verholzender und nicht verholzender Pflanzen untersucht sowie Spezies, die C<sub>3</sub> oder C<sub>4</sub> Photosynthese betreiben.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wird das Thema der Signalverarbeitung simultaner unterschiedlicher Stimuli näher betrachtet. Dabei werden im Besonderen Spurenelement- und Nährstoffzusammensetzungen, physiologische und makro- und mikroskopische Aspekte untersucht, um sich ergebende Unterschiede analysieren zu können.





# KAPITEL 2

---

## Anatomische und physiologische Grundlagen

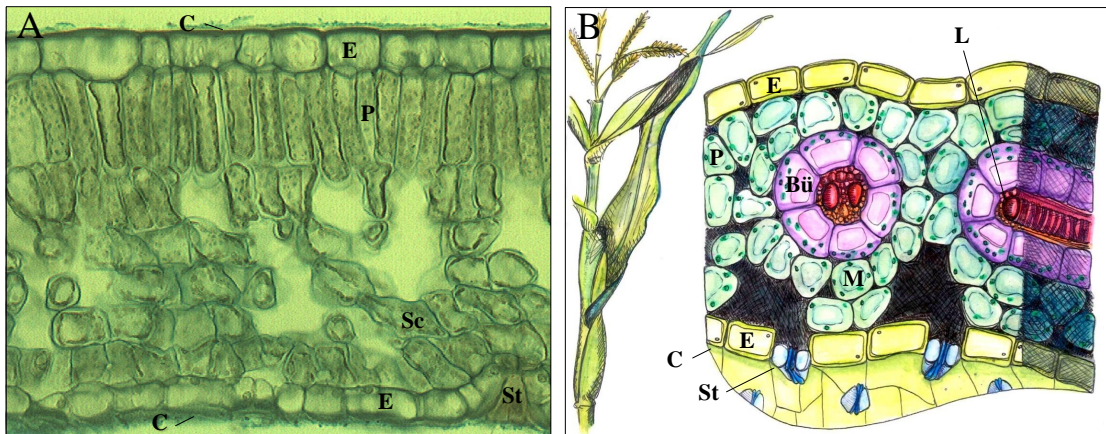
---

Für ein besseres Verständnis der gesamten Dissertationsschrift werden im Folgenden theoretische Grundlagen zu anatomischen und physiologischen Aspekten der pflanzlichen Lebensvorgänge dargelegt.

### 2.1 Blattaufbau

Die Blätter bilden eines der drei Grundorgane (Wurzel und Spross/Stängel) der Pflanzen und werden in Epiphyll (Oberblatt) und Hypophyll (Unterblatt) unterteilt. Das Hypophyll besteht aus dem Blattgrund und den eventuell auftretenden Nebenblättern. Das Epiphyll hingegen wird aus der Blattspeite und dem Stiel gebildet.

Der Blattaufbau gliedert sich von oben nach unten in die Cuticula (C), Epidermis (E), Palisadenparenchym (P), Leitbündel (L), Bündelscheide (Bü), Schwammparenchym (Sc) (nur C<sub>3</sub>), Mesophyllzellen (M) (nur C<sub>4</sub>), Epidermis mit Stomata (St) und die Cuticula (Abb. 2.1). Ebenso wie C<sub>4</sub> Blätter verfügen auch C<sub>3</sub> Blätter über Bündelscheidenzellen und Leitbündel (nicht dargestellt), diese sind aber im Vergleich wesentlich kleiner als bei den C<sub>4</sub> Blättern und nicht von einer Kranzanatomie der Mesophyllzellen umgeben.



**Abbildung 2.1: Blattaufbau.** (A) C<sub>3</sub> Blattaufbau (lizenzierte Abbildung verändert nach (V44020001, 2009)) (B) C<sub>4</sub> Blattaufbau *Zea mays* (lizenzierte Abbildung verändert nach (Shi, 2013)). Indices: Cuticula (C), Epidermis (E), Palisadenparenchym (P), Leitbündel (L), Bündelscheide (Bü), Schwammparenchym (Sc), Mesophyllzellen (M), Stomata (St).

### 2.1.1 Stomata

Es gibt unterschiedliche Formen der Stomata-Anordnung auf den Blattseiten. Als hypostomatisch bezeichnet man die häufigste Form, in der die Stomata auf der Blattunterseite zu finden sind. Diese Position bietet einen Schutz vor direktem Sonnenlicht. Seltener ist eine Ausbildung auf der Blattoberseite (epistomatisch) vorhanden, wie zum Beispiel bei Seerosen. Eine beidseitige Ausbildung der Stomata wird als amphistomatisch deklariert. Diese tritt bei Gräsern (z. B. Mais) und Nadelbäumen auf. Das Öffnen und Schließen der Stomata beruht auf verschiedenen Ionenflüssen.

Beispielsweise schließt die *Phoenix dactylifera* (echte Dattelpalme) ihre Stomata durch einen Nitrat-regulierten Anionenkanal, dabei ist, genauso wie beim Mais (Raschke und Fellows, 1971), das Chlorid das Gegenanion zum Kalium Kation (Müller et al., 2017). Cowan und Farquhar setzten 1977 als Grundhypothese voraus, dass Wachstum und Entwicklung der Assimilation entspricht und über die Stomata möglichst wenig Wasser für den aufgenommenen Kohlenstoff im tageszeitlichen Verlauf transpiriert werden soll. Laut der Wassernutzungseffizienz von *Meryta sinclairii* wird pro transpiriertem  $\mu\text{mol H}_2\text{O}$  durchschnittlich  $0,093 \mu\text{mol CO}_2$  bei  $25^\circ\text{C}$  und  $400 \text{ ppm CO}_2$  fixiert (Kirkham, 2005). Cowan und Farquhar empfanden eine Anpassung daran als optimal, beobachteten aber zeitgleich, dass Wasserdampf ca. 1,6-mal schneller durch die Stomata diffundiert als  $\text{CO}_2$  (Cowan und Farquhar, 1977). Sie sahen die stomatäre Funktion und Anpassung als ausgereifter als die der Gesamtpflanze und nannten als Beispiel *Prunus ameniaca* in der Wüste Negev

(Israel).

Der Spaltöffnungsapparat besteht aus den Schließ- und Nebenzellen, letztere liefern die Ionen und das Wasser für den Mechanismus. Die Öffnung der Stomata erfolgt generell durch eine Erhöhung des Turgors der Schließzellen durch die Aufnahme von verschiedenen Kationen und Anionen. Wenn photosynthetisch nutzbares Licht auf das Blatt trifft, werden über die ATPase Protonen ( $H^+$ ) in den Apoplasten transportiert. Das dadurch resultierende Konzentrationsgefälle (niedriger pH-Wert, *potentia Hydrogenii* (pH)) sorgt für die Öffnung der Kaliumkanäle, was einen Einstrom von  $K^+$  initiiert (Evert et al., 2009). Die Ladung gleichen Malat und/oder  $Cl^-$  in den Zellen aus. Aufgrund des osmotischen Potentials strömt Wasser nach. Diese Turgordruckerhöhung sorgt für ein Anschwellen und Öffnen der Schließzellen. Dies hat letztendlich eine Öffnung der Stomata zur Folge.

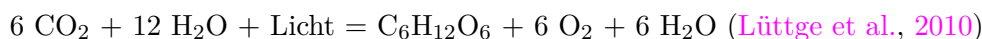
Bei Wassermangel kommt es zu einer hydroaktiven Schließung der Stomata durch Abscisinsäure. Diese wird durch ein reduziertes Wasserpotenzial in den Wurzeln zunehmend gebildet und induziert eine bessere Permeabilität des Plasmalemmas der Schließzellen der Blätter. Dadurch wird der Ausstrom von  $K^+$  und zwangsläufig Wasser ermöglicht, was wiederum ein Schließen der Stomata bedingt (Matyssek et al., 2010).

Im Rahmen von Blattverwundungen und Trockenstress spielt auch der sogenannte Iwanow-Effekt eine Rolle. Dieser beschreibt die hyropassive Stomataöffnung durch plötzlichen Turgorverlust der umliegenden Epidermiszellen (Weiler und Nover, 2008).

Von Chaves et al. (2002) wurde zusammengefasst, dass stomatäre Reaktionen oft enger mit dem Feuchtigkeitsgehalt des Bodens als mit dem Blattwassergehalt zusammenhängen (Chaves et al., 2002).

## 2.2 Photosynthese

Die Photosynthese ermöglicht es den heterotrophen Organismen auf der Erde zu überleben (Weiler und Nover, 2008). Bei diesem Stoffwechselweg werden mittels Lichtenergie aus  $CO_2$  unter Spaltung von  $H_2O$  Kohlenhydrate und molekularer Sauerstoff ( $O_2$ ) gebildet. Die Formel der Photosynthesereaktion entspricht:



Die Photosynthesereaktion umfasst dabei zwei Abschnitte: Die Lichtreaktion und den Calvin Zyklus. Die Lichtreaktion findet in den Thylakoiden des Chloroplasten statt und liefert die reduzierten Co-Substrate und das ATP für den im Stroma ablaufenden Calvin-Zyklus, der die Assimilation der Reaktion darstellt (Weiler und Nover, 2008) (Purves et al., 2006). Der Lichtsammelkomplex ist maßgeblich an der Lichtreaktion beteiligt, indem er die Photonen absorbiert. Das im Reaktionszentrum befindliche Chlorophyll des Photosystem

II erfährt eine Anregung, dadurch wird ein Elektron auf die Elektronentransportkette übertragen. Durch die Spaltung von  $\text{H}_2\text{O}$  in  $\text{O}_2$  und  $2\text{H}^+$  und Elektronen wird der Elektronenmangel gespeist (Xiong und Bauer, 2002). Die Elektronentransportkette transportiert das Elektron zum Photosystem I. Dort wird die  $\text{NADP}^+$ -Reduktase betrieben und zusätzlich durch die Elektronentransportkette ein chemiosmotischen Protonen-Gradienten Protonen im Thylakoidlumen erzeugt. Dieser ermöglicht die Adenosintriphosphat (ATP)-Synthese.

Direkt an die Lichtreaktion ist der Calvinzyklus zur Bildung der Kohlenhydrate aus  $\text{CO}_2$  im Stroma angeschlossen. Dabei werden die vorher gebildeten Reduktionsäquivalente (ATP, NADPH und  $\text{H}^+$ ) verbraucht. Die Reaktion wird durch das Kohlenstoff-fixierende Enzym Ribulose-1,5-bisphosphat-carboxylase/-oxygenase (RubisCO) katalysiert. Das erste Produkt dabei ist 3-Phosphoglycerat (3PG). Im zweiten Schritt, der die Reduktion und Zuckersynthese umfasst, wird 3PG zu Glycerinaldehyd-3-Phosphat (G3P) unter Verbrauch der Reduktionsäquivalente reduziert. Nach 3 Zyklen kann  $\frac{1}{6}$  des G3P für die eigentlichen Kohlenhydratsynthese verwendet werden. Die anderen  $\frac{5}{6}$  dienen im finalen Schritt zur Regeneration von Ribulose 1,5 bisphosphat (RuBP) aus Ribulosemonophosphat (RuMP) unter ATP Verbrauch (Purves et al., 2006).

Eine stärkere Lichteinstrahlung bedingt eine höhere Photosyntheserate am  $\text{CO}_2$  Sättigungspunkt. Die Sättigung tritt durch die Limitation der Reduktionsäquivalente ATP und  $\text{NAD(P)H}$  und  $\text{H}^+$  ein.

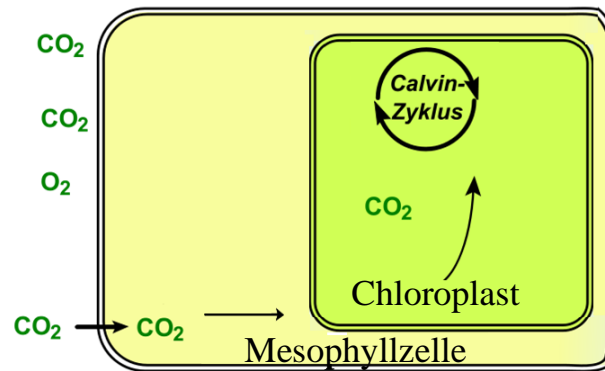
Am Lichtkompensationspunkt kommen drei Prozesse zusammen. Zum einen die reelle Photosynthese, welche nur im Licht stattfindet. Zum anderen die Photorespiration und letztendlich die Atmung.

Laut Chee et al. erzeugt der Photosyntheseprozess in Pflanzen zahlreiche Bioenergiequellen. Es wurde festgestellt, dass der aus Pflanzen erzeugte Strom unter Sonnenlicht im Vergleich zum dunklen Zustand deutlich zunahm. Dies zeigt, dass der Photosyntheseprozess die Stromaktivität in der Pflanze erhöht (Chee et al., 2016).

### 2.2.1 $\text{C}_3$ Photosynthese

Die  $\text{C}_3$  Photosynthese ist die am weitesten verbreitete Form der Photosynthese (Abb. 2.2). Der Ablauf dieser wird ausführlich in Kapitel 2.2 beschrieben.

## C<sub>3</sub> Photosynthese



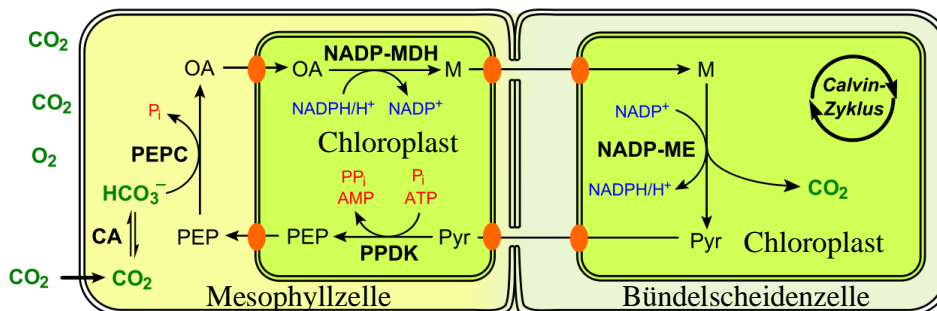
**Abbildung 2.2: C<sub>3</sub> Photosynthese.** C<sub>3</sub> Photosynthese (Abbildung erstellt auf Grundlage der lizenzierten Abbildung verändert nach (Yikrazuul, 2011)).

Sie zeichnet sich durch eine erhöhte Photorespirationsrate aus. Der primäre CO<sub>2</sub> Akzeptor und zeitgleich das fixierende Enzym RubisCO agiert sowohl als Oxygenase als auch als Carboxylase. Die Fixierung von CO<sub>2</sub> läuft 10-fach bevorzugt ab, dabei entsteht 3-Phosphoglycerat (3PG). Allerdings ist die Affinität der Reaktion nur durchschnittlich. Die Reaktion findet in den Mesophyllzellen des Blattes der jeweiligen Pflanze statt. Bei der Fixierung in den Chloroplasten einer Art müssen viele Widerstände überwunden werden (Purves et al., 2006), z. B. die innere und äußere Chloroplastenmembran.

### 2.2.2 C<sub>4</sub> Photosynthese

Hohe Temperaturen begünstigen die Photorespiration in der C<sub>3</sub> Photosynthese, sodass die evolutionär angepasste C<sub>4</sub> Photosynthese (Abb. 2.3) für warme Klimate ca. 30 Millionen Jahren vor unserer Zeit (im Oligozän) entstand (Sage und Stata, 2015).

## C<sub>4</sub> Photosynthese



**Abbildung 2.3: C<sub>4</sub> Photosynthese.** Die Beschriftung entspricht: Phosphoenolpyruvat (PEP); Oxalacetat (OA); Malat (M); CA ( $\alpha$ -Carboanhydrase); Pyruvat (Pyr); PEP-Carboxylase (PEPC); Pyruvat-Phosphat-Dikinase (PPDK); NADP-abhängige Malatdehydrogenase (NADP-MDH) und NADP-abhängiges Malatenzym (NADP-ME) (lizenzierte Abbildung verändert nach (Yikrazuul, 2011)).

Die Photorespiration tritt nur maginal bei der C<sub>4</sub> Photosynthese auf, da der primäre CO<sub>2</sub> Akzeptor die Phosphoenolpyruvatcarboxylase (kurz: PEP-Carboxylase) ist und gleichzeitig als fixierendes Enzym neben der RubisCO wirkt. Dabei hat die PEP eine hohe Affinität für CO<sub>2</sub>. Die Reaktion ist räumlich getrennt im Cytosol durch die Fixierung in den Mesophyllzellen als Oxalacetat und anschließender Umwandlung und Weiterleitung als Malat in die Bündelscheidenzelle, in der der Calvin-Zyklus abläuft (Purves et al., 2006). Bündelscheidenzellen sind einer sogenannten Kranzanatomie angeordnet, d. h. diese umschließen kranzförmig das Phloem (siehe Abb. 2.1 B).

Insgesamt wurden mittlerweile ca. 8100 C<sub>4</sub> Arten gefunden, von denen 5044 zu den Süßgräsern, 1322 zu den Sauergräsern und 1777 zu den Eudikotyledonen zählen (Sage, 2017). Laut Sage (2017) gehen diese auf 61 unabhängige Linien der C<sub>4</sub> Photosynthese zurück.

In dieser Arbeit wurde das Süßgras *Zea mays* untersucht.

### 2.3 Wasserhaushalt

Im Rahmen dieser Arbeit werden Pflanzen häufig in einen Trockenstresszustand versetzt und untersucht. Da der Wasserhaushalt und damit einhergehend das Wasserpotenzial der entscheidende Faktor für den Stoffwechsel der Pflanze ist. Wasser ist im pflanzlichen System permanent im Fluss durch die Transpiration, Wiederaufnahme und Weiterleitung. Der Wasserhaushalt ist zu definieren als:

$$\text{Wasserhaushalt} = \text{Adsorption} - \text{Transpiration}$$

Durch ein ungleiches Wasserpotenzial entsteht eine Saugspannung. Dieses kann durch ein Tensiometer gemessen werden. Dabei entsprechen die hPa der mbar Angabe. Larcher beschrieb 2001, dass der Wassertransport in Richtung des negativerem/niedrigeren Wasserpotenzials in einem thermodynamischen Gleichgewicht erfolgt.

Durch den Wasserverlust nimmt das Volumen der Vakuole ab. Sollte der Turgornullpunkt erreicht werden, kann die Zellwand nicht noch weniger Druck auf den Protoplasten ausüben und somit nicht weiter zusammenfallen (Larcher, 2001), sodass es zur Grenz-Plasmolyse kommt. Bei dieser löst sich der Protoplast von der Zellwand ab (Matyssek et al., 2010). Bartlett et al. (2012) zeigten, dass es der Turgordruck ist, der die Welkebildung bestimmt. Außerdem beschrieben die Autoren, dass die Anpassung der Elastizität und des Sklerophyll (Hartblättrigkeit) die Dehydratation verhindern und zusätzlich vor nährstoff-, mechanischem und pflanzenfressendem Stress unabhängig der Dürretoleranz schützen (Bartlett et al., 2012).

Meist entsteht ein Wasserdampfdruckdefizit zwischen der Blattoberfläche und der Luft, da die Erwärmung der Blattoberfläche eine schnellere Verdunstung und somit einen steileren Dampfdruckgradienten zur Folge hat. Das Blattwasserpotenzial hängt von dem im Blatt vorhandenen cuticulären und stomatären Diffusionswiderständen ab, dabei gibt es einen linearen Zusammenhang zwischen der Blattleitfähigkeit und dem Öffnungsgrad der Stomata. (Larcher, 2001)

Die cuticuläre Transpiration gibt Larcher (2001) für „zarte Blätter“ mit  $10 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  –  $15 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  und für Blätter und Nadeln mit  $0,5 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  –  $3 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  an. Zusätzlich spielt die stomatäre Verteilung für Diffusionsgeschwindigkeit eine zentrale Rolle und ist bspw. bei *Zea mays* serial angeordnet.

Als letzter Aspekt ist für den Wasserhaushalt die Verfügbarkeit von Wasser im Boden ausschlaggebend. Das Wasser im Boden liegt als (gebundenem) Haft- und (freien) Senkwasser vor. Die Wurzeln weisen ein negatives Wasserpotenzial auf, um Haftwasser für die Pflanze nutzbar machen zu können. Der Wassersättigungsgehalt des Bodens wird als sogenannte Feldkapazität bestimmt und ist ansteigend in der Reihe von Sand, Lehm, Ton, Rohhumus (Larcher, 2001). Die Wurzeln von Kulturpflanzen humider Regionen erzeugen Saugspannungen von -1 MPa bis -2 MPa die von Wechselfeuchtenpflanzen (Mesophyten) bis zu -4 MPa. Der Wurzelwassertransport kann initial zwei unterschiedliche Wege nehmen: Erstens den protoplastischen Pfad von der Zellkette über das Rindenparenchym bis zum Zentralzylinder und zweitens den apoplastischen Pfad zwischen der Zellwand bis zur Endodermis, ab dieser dann im Weiteren symplastisch. Das Wurzelwachstum an sich ist bei flachgründigen, verdichteten oder nassen Böden behindern und bei kalten Böden sogar verzögert (Larcher, 2001).



Für Weiterleitung/spezifische Leitfähigkeit des durch die Wurzel aufgenommenen Wassers wird das Gesetz von Hagen-Poiseuille angewendet. Dieses beschreibt, dass bei einer Verringerung des Gefäßradiuses die Fließgeschwindigkeit um den Exponent 4 dieses abnimmt durch die potenzierte Zunahme der Reibung:

$$Q = \frac{\pi * r^4}{8\mu} * \frac{p_1 - p_2}{l}$$

Dabei entspricht Q: Fließgeschwindigkeit durch das Gefäß (V/t),  $\mu$ : dynamische Zähigkeit der strömenden Flüssigkeit, r: Radius des Gefäßes,  $p_1/p_2$ : Druckdifferenz zwischen Anfang und Ende des Gefäßes, l: Länge des Gefäßes (verändert nach <https://www.spektrum.de/lexikon/physik/hagen-poiseuillesches-gesetz/6267>; 03.04.2019, 11:40).

## 2.4 Circadianer Rhythmus

Viele Prozesse in der Pflanze werden durch den circadianen Rhythmus gesteuert. Zum Beispiel zeigten Dziubinska et al (2003), dass die Ethylenemission einen klaren circadianen Rhythmus abhängig vom Dunkel-/Hellverhältnis folgt (Dziubinska et al., 2003). Dabei wurde Ethylen am meisten nach einer Dunkelperiode mit einer anschließenden Belichtung von 3 bis 6 Stunden emittiert. Die Ethylenproduktion fand ihr Minimum nach 9 bis 12 Stunden Belichtung.

Volkov et al. (2011) konnten an *Clivia miniata* (Klivia) mithilfe von spannungsgesteuerten Ionenkanälen zeigen, dass Tag und Nacht gespeichert werden, sodass bei Dauerlicht eine Erhöhung des Eingangswiderstandes auf den Nachtzeitwert erfolgt (Volkov et al., 2011). In einer darauffolgenden Studie von 2012 wurden die Ergebnisse für die *Aloe Vera* (echte Aloe) und *Mimosa pudica* Pflanzen reproduziert (Volkov et al., 2012).

## 2.5 Nährstoffe

Die Makronährstoffe sind diejenigen, die zum einen überlebenswichtig für die Pflanze sind und zum anderen in größeren Mengen gebraucht werden: Kohlenstoff (C), Wasserstoff (H), Sauerstoff (O), Stickstoff (N), Phosphor (P), Kalium (K), Calcium (Ca), Magnesium (Mg), Schwefel (S) und Eisen (Fe).

Die Mikronährstoffe werden nur in geringen Mengen im Vergleich zu den Makronährstoffen gebraucht. Ein Mangel oder Überschuss dieser Spurenelemente (Chlor (Cl) (Regulation Schließzellen), Mangan (Mn) (Katalysator  $H_2O$  Spaltung Photosystem II; Chloroplastenstrukturstabilisierend, Nucleinsäuresynthese), Zink (Zn) (Co-Faktor; Metalloenzyme), Kupfer (Cu) (Atmungskette (Endoxidase), Plastocyanin), Bor (B) (Meristemfunktion, Pollenschlauchwachstum, Kohlenhydrattransport und Stoffwechsel), Molybdän (Mo) (Cofaktor der Nitrogenase und einiger Metalloenzyme (Nitrat-Reduktase), Molybdopterin)) führt



aber ebenso zu krankhaften Veränderungen des pflanzlichen Gewebes.

Die Funktion der unterschiedlichen Elemente ist vielfältig und soll kurz, wenn auch nicht umfassend vorgestellt werden (Bresinsky et al., 2008)(Weiler und Nover, 2008) (Purves et al., 2006) (Lüttge et al., 2005):

- Wasser  
Das „biologische Lösungsmittel“.
- Kohlenstoff  
Alle organischen Verbindungen.
- Sauerstoff  
Viele organische Verbindungen; erhöht die Polarität bei z. B. Zucker oder organische Säuren.
- Stickstoff  
Wachstum, Bildung der DNA-Basen sowie Chlorophyll. Bestandteil: Co-Enzyme; Aminosäuren und Protoplasma.
- Phosphat  
Proteine und Enzyme, Phosphat-Rückgrat der DNA, Energieübertragung (ATP), Zellwände (Strukturproteine), Phosphorylierung.
- Kalium  
Regulation Spaltöffnungsapparat, Membranpotentiale, Osmoregulation, Enzymaktivität (Photosynthese und Nitrat-Reduktase). Gegenion:  $\text{Cl}^-$ ; Synergisten:  $\text{Na}^+$  und  $\text{NH}_4^+$ .
- Calcium  
Signalmolekül, Membranstruktur, Zellteilung, Entwicklungsprozesse (z. B. Zellwandsynthese), Vernetzung der Zellwand und Mittellamelle, Behebung von Stressschäden (Lautner und Fromm, 2010). Antagonist:  $\text{K}^+$ ;  $\text{Mg}^{2+}$ . Enzymaktivator (Amylase und ATPase) und Cofaktor, Regulation der Streckung.
- Magnesium  
Chlorophyll Bestandteil, Ribosomen, Enzymaktivator; Photosynthese Phosphattransfer. Antagonist:  $\text{Ca}^{2+}$ ; Synergisten:  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ .
- Schwefel  
Schwefelbrücken z. B. Glutathion, Proteine, Schutz. Bestandteil des Protoplasma und von Enzymen.

- Eisen  
Oxydoreduktion, N-Stoffwechsel und Chlorophyllsynthese.

Entnommen aus (Lüttge et al., 2005) (Purves et al., 2006) (Bresinsky et al., 2008)(Weiler und Nover, 2008).

## 2.6 Pflanzenarten und Bedeutung

Die in dieser Arbeit verwendeten Pflanzenarten haben jeweils eine große kulturelle, ernährungswirtschaftliche oder wissenschaftliche Bedeutung und werden im Folgenden vorgestellt.

### 2.6.1 *Acer pseudoplatanus*

*Acer pseudoplatanus*, der Berg-Ahorn, gehört zu den Eudikotyledonen. Diese Art ist Teil der Ordnung der Seifenbaumartigen (*Sapindales*) und stammt aus der Familie der Seifenbaumgewächse (*Sapindaceae*). Als Gattung gehört dieser zu den Ahornen (*Acer*). In Mitteleuropa ist *Acer pseudoplatanus* die häufigste Ahornart und besitzt somit eine kulturelle Bedeutung. Diese erfüllt auch umweltökologische Aspekte, durch die Lärminderung sowie Feinstaub- und Treibhausgas-Reduktion (Schmidt und Roloff, 2009).

### 2.6.2 *Glycine max L.*

Ebenso gehört *Glycine max L.*, die Sojabohne, zu den Eudikotyledonen und betreibt eine C<sub>3</sub> Photosynthese. Sie ist in der Ordnung der Schmetterlingsblütenartigen (*Fabales*) zu finden und Bestandteil der Familie der Hülsenfrüchtler (*Fabaceae/Leguminosae*). Die Gattung ist hier *Glycine*. Für die Stickstoffversorgung entwickelte sich eine sojaspezifische Symbiose mit dem Knöllchenbakterium *Bradyrhizobium japonicum* (Heyland, 1996).

2011 wurde gezeigt, dass die frühesten Belege für Sojabohnen aus Nordchina von 7000 v. Chr. und aus Japan von 5000 v. Chr. stammen. Dabei sind die ältesten Belege für große, gezüchtete Bohnen in Japan von 3000 v. Chr. zu finden (Lee et al., 2011). Heute besitzt die Sojabohne ein großes ernährungswirtschaftliches Interesse. Sodass im Jahr 2018/19 das Landwirtschaftsministerium der Vereinigten Staaten (USDA) eine weltweite Erntemenge von ca. 355,2 Millionen Tonnen Sojabohnen prognostizierte (<https://de.statista.com/statistik/daten/studie/218940/umfrage/produktionsmenge-von-sojabohnen-weltweit/>). Dabei werden 90 % als Sojaschrot für die Tierfutterproduktion eingesetzt und die restlichen 10 % werden zu Sojaöl für die Lebensmittelproduktion verarbeitet (Kohler, 2014).

Da unterschiedliche mit Soja durchgeführte Studien für die Vergleichbarkeit der gewonnenen Ergebnisse herangezogen wurden, bei denen nicht immer eindeutig benannt ist, ob es

sich um *Glycine max L.* handelte, sind die Forschungsergebnisse von Singh und Hymowitz (1988) von Interesse. Sie zeigten, dass die kultivierte Sojabohne *Glycine max (L.) Merr.* und die Wildsojabohne *G. soja* vermutlich ein ähnliches Genom besitzen, da durch die Kreuzung beider Arten lebensfähige F<sub>1</sub> Hybride entstehen (Singh und Hymowitz, 1988).

### 2.6.3 *Mimosa pudica*

*Mimosa pudica* gehört der gleichen Ordnung und Familie wie *Glycine max L.* an (Schmetterlingsblütenartige (*Fabales*); Hülsenfrüchtler (*Fabaceae/Leguminosae*)), aber der Gattung der Mimosen (*Mimosa*). Im Lehrbuch Strasburger wird die Mimose als ein pantropisches Unkaut klassifiziert (Bresinsky et al., 2008).

Das Interesse an dieser Pflanze ist in keinster Weise ernährungswirtschaftlich, da sie als ungenießbar, aber nicht giftig kategorisiert ist (Bresinsky et al., 2008). Die Besonderheit der Mimose sind ihre seismonastischen Reaktionen auf Stimulation, welche bereits in den 1960er Jahren detailliert untersucht wurden (Allen, 1969) (Sibaoka, 1969). Diese machen die Reizweiterleitung optisch sichtbar. Dadurch wurde die *Mimosa pudica* neben der *Dionaea muscipula* (Venusfliegenfalle) zu einer der Modellpflanzen für die elektrische Signalweiterleitung in pflanzlichem Gewebe.

### 2.6.4 *Zea mays*

*Zea mays L.*, der Mais, ist eine monokotyledone Pflanze. Sie gehört in die Ordnung der Süßgrasartigen (*Poales*) zu der Familie der Süßgräser (*Poaceae*) und in die Gattung *Zea*. Das Wort *Zea mays* ist eine Kombination aus dem Altgriechischen „ζεα“ *Zea*. Dieses steht für Dinkel, Spelt und dem Neulateinischem *mays* (Genaust, 2005). Mais ist eins der wichtigsten Getreide der Welt. Dies spiegelt sich auch den Zahlen der USDA für 2018/19 wieder. Sie gehen von einer weltweiten Erntemenge von ca. 1,1 Milliarden Tonnen Mais aus (Quelle: <https://de.statista.com/statistik/daten/studie/456592/umfrage/erntemenge-von-mais-weltweit/>).

Im Gegensatz zu Soja ist die Verwendungsmöglichkeit wesentlich vielfältiger, sodass Mais nicht nur bei Lebensmitteln und Kleidung, sondern auch als Plastikersatz und Treibstoff eingesetzt wird (Frietsch, 2018).

## 2.7 Signalarten und -weiterleitung im pflanzlichen Gewebe

Es gibt viele unterschiedliche Reize, denen eine Pflanze ausgesetzt sein kann, besonders durch ihre sessile Lebensweise, die eine Anpassung auf bestehende Bedingungen unabdingbar macht. Die biotischen und abiotischen Stimuli können spezifische Signale hervorrufen, um eine Anpassung durch z. B. eine veränderte Genexpression möglich zu machen.

Beispielsweise wurde die Hypokotyllänge bei *Helianthus annuus* (Sonnenblume) durch osmotischen und Salzstress stark verkürzt. Die Circumnutation nahm aufgrund des osmotischen, aber nicht salzigen Stresses ab. Dies lässt auf eine unterschiedliche Modulation durch beide Stressfaktoren für das Hypokotylwachstum und die Circumnutation schließen (Stolarz und Dziubinska, 2017).

Die möglichen Stressfaktoren sind in der nach Larcher 2001 veränderten Tabelle 2.1 dargestellt.

**Tabelle 2.1: Auslöser pflanzlichen Stresses.** Auflistung verändert nach (Larcher, 2001) und ergänzt durch die Signalarten aus (Gallé et al., 2015). AP Aktionspotenzial; VP Variationspotenzial

Abiotisch		Biotisch	
Art	Auslöser	Art	Auslöser
Strahlung	Mangel; Überschuss; UV; Blitz (Gora und Yanoviak, 2015)	Pflanzen	Konkurrenz; Allelopathie; Parasiten
Temperatur	Hitze (VP); Kälte (AP); Frost	Schädlinge	Viren; Bakterien; Pilze; Insekten
Wasser	Luft- Bodentrockenheit; Überflutung, Wiederbewässerung (VP)	Tiere	Fraß (VP); Tritt (VP)
Gase	O <sub>2</sub> Mangel, Vulkanausbruch	Anthropogen verursacht	Immissionen, Agrochemikalien, Bodenverdichtung, Feuer, Ionisierende Strahlung, Elektromagnetische Felder
Mineralstoffe	Mangel; Überschuss; Unausgewogen; Schwermetalle		
pH Veränderungen	Salinität; Acidität; Alkalinität		
Mechanisch	Wind (AP); Bodenbewegung; Verschüttung; Schnee-/Eis-Bedeckung		

Die Signalübertragung kann dabei durch Ionen oder Botenstoffe (bspw. Phytohormonen) erfolgen.

### 2.7.1 Elektrische Signalweiterleitung

Darwin zeigte bereits, dass die Venusfliegenfalle auf Reize reagiert (Darwin, 1875). Neben der Venusfliegenfalle ist eine weitere Modellpflanze *Mimosa pudica*, die für ihre elektrische Signalweiterleitung durch nastische Bewegungen der Fiederblätter bekannt ist. Bei dieser Art der Informationsverbreitung wird zwischen Aktions- und Variationspotenzial

unterschieden. Das Aktionspotenzial scheint sich ohne Abnahme der Geschwindigkeit oder Größe zu verbreiten, während die Signalstärke des Variationspotenzials mit der Entfernung signifikant abnimmt (Stankovic et al., 1998). Dabei wird eine Verschiebung zu negativeren Membranpotenzialen als Hyperpolarisation bezeichnet, wohingegen eine positive Verschiebung eine Depolarisation ist (Spalding, 2000).

Pflanzen stellen adhäsive Kontakte her, die die Kommunikation von Zelle zu Zelle zwischen den Wirtszellen organisieren, wenn diese mit Pathogenen, Parasiten und potenziellen Symbionten belastet werden. Baluska et al. schlugen 2005 vor, dass diese Haftkontakte den immunologischen Synapsen ähneln, die bei Tieren gefunden werden (Baluska et al., 2005). Laut Wildon et al. (1992) sind pflanzliche Zellen, die durch Plasmodesmen verbunden sind, analog zu tierischen Epithelzellen, die durch Spaltverbindungen verbunden sind, zur Weiterleitung von elektrischen Signalen fähig (Wildon et al., 1992).

Ebenso sah Krol et al. (2007) durch Versuche an *Conocephalum conicum* (Leberkraut) eine stärkere Analogie zwischen erregbaren Pflanzen- und Tierzellen durch das Vorhandensein von echten Glutamatrezeptor (iGluR) in beiden Zelltypen (Krol et al., 2007).

Davies (1993) vergleicht bildlich die Weiterleitung durch Aktionspotenziale im tierischen Nervensystem mit einem Telefon, bei dem nur der Empfänger beeinflusst wird. Im Gegensatz dazu setzt er elektrische Signale im pflanzlichen System mit einem Megaphon gleich, das alle Gewebe zwischen Sender und Empfänger stimuliert (Davies, 1993). Gallé et al. (2015) schlussfolgerten, dass verschiedene Stimulationstypen charakteristische elektrische Signale auslösen, die jeweils einen spezifischen Einfluss auf physiologische Prozesse haben (Gallé et al., 2015).

Pickard wies 1972 mithilfe von extrazellulären Elektroden nach, dass sowohl *Ipomoea* (Prunkwinden), *Pisum* (Erbsen) als auch *Xanthium* (Spitzenkletten) beim Wuchs des Sprosses spontane Potenziale unabhängig der Lichtbedingungen generieren (Pickard, 1972). Scherzer et al. entschlüsselten 2017 den optisch sichtbaren Mechanismus der Venusfliegenfalle beim Beutefang. Durch das Insekt werden die berührungsempfindlichen Haare innerhalb der Falle stimuliert, dies löst elektrische Wellen aus. Diese dadurch ausgelösten Aktionspotenziale bewirken ein schnelles Schließen der Falle und aktivieren die sekretorischen Funktionen der Drüsen. Die Drüsenzellen aktivieren Jasmonat-Signale, die die Bildung von Sekretvesikeln fördern (Scherzer et al., 2017).

Die Ausbreitung elektrischer Signale erfolgt hauptsächlich in leitenden Bündeln (Vodeneev et al., 2016).

### 2.7.1.1 Aktionspotenziale

Laut der Redaktion von Pflanzenforschung.de werden durch ein pflanzliches Aktionspotential die Ladungen in der Zelle minimiert. Sie schließen daraus, dass evolutionär betrachtet die Funktion eines Potentials darin bestand, die im Meerwasser gelösten Salze (explizit  $\text{Cl}^-$  und  $\text{K}^+$ ) abzugeben, um eine Versalzung zu verhindern (Pflanzenforschung.de, 2009). Goldsworthy sah 1983 den evolutionären Grund für Aktionspotenziale im Membranreparaturmechanismus, bei dem eine Depolarisierung der beschädigten Membran nötig ist (Goldsworthy, 1983).

Aktionspotenziale spielen eine Rolle bei der Signalweiterleitung von nicht gewebeschädigenden Reizen wie bei Kälte oder der Wiederbewässerung nach Trockenstress. Für sie ist ein sehr ähnlicher Verlauf charakteristisch. Der Reiz muss einen Schwellenwert überschreiten, dann kommt es zu einer Depolarisation mit anschließender Repolarisation, die in einer Hyperpolarisation endet, bevor die Refraktärzeit beginnt und eine neue Stimulation möglich ist. Davies (2004) empfand als kennzeichnend für ein Aktionspotential, dass dieses durch die zuvor beschriebene vorübergehende Änderung des Membranpotentials ausgelöst wird und sobald das Signal weiter geleitet wurde wieder in den Ausgangszustand zurückkehrt. Die Allgegenwärtigkeit des pflanzlichen Aktionspotentials war dabei für ihn entscheidend (Davies, 2004). Die  $\text{Cl}^-$ - und  $\text{K}^+$ -Ionen sind dabei maßgeblich verantwortlich (Lüttge et al., 2005).

Fromm und Bauer (1994) sahen diese auch als Träger für das Maisaktionspotential. Sie konnten keine Potenziale bei einem kürzeren Stimulus als 2 Sekunden oder weniger als 3 V Spannung induzieren. Die gemessene Refraktärzeit setzte 50 Sekunden nach dem Aktionspotential ein (Fromm und Bauer, 1994).

Davies beschrieb 1987 den ionischen Mechanismus von Aktionspotentialen. Er formulierte, dass durch  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Cl}^-$  bei dem Einstrom als auch durch  $\text{K}^+$  beim Ausstrom die Bildung des Potentials herbeigeführt wird (Davies, 1987). Die Aktionspotenziale werden dabei über Phloemsiebröhren und ihre Geleitzellen übertragen (Davies und Stankovic, 2006).

### 2.7.1.2 Plasmodesmen

Die Plasmodesmen bieten einen direkten Weg für die Diffusion von Ionen zwischen den Internodien von *Nitella translucens* (schimmernde Glanzleuchteralge) (Spanswick und Costerton, 1967). Obwohl Spanswick und Costerton an zwei riesigen internodalen Zellen von *Nitella* zeigten, dass der spezifische Widerstand des Knotens 50-mal kleiner ist als der spezifische Widerstand des internodalen Zellplasmalemmas (und dieser eigentlich um den Faktor 330 kleiner sein sollte als der beobachtete Wert), schlossen sie auf eine Diffusionsbeschränkung der Ionen in den Plasmodesmen. Dennoch war für sie bereits 1967

offensichtlich, dass trotz der Diffusionsbeschränkung für Ionen der Plasmodesmen diese ein wesentlich effizienteres Mittel zum interzellulären Transport darstellen als die Alternative der Sekretion und Reabsorption mit der damit verbundenen Verschwendung von Energie und Materialien (Spanswick und Costerton, 1967).

Spanswick fand weiter 1972 heraus, dass der tatsächliche spezifische Widerstand des Plasmalemmas mindestens doppelt so hoch ist wie der gesamte scheinbare Widerstand von Plasmalemma und Tonoplast in Serie (Spanswick, 1972).

### 2.7.1.3 Variationspotenziale

Variationspotenziale treten im pflanzlichen Gewebe auf, wenn starke Gewebeschädigungen wie z. B. durch einen Feuerreiz oder Verwundung entstehen. Sie weisen im Gegensatz zu den Aktionspotenzialen einen variablen Verlauf auf und die Geschwindigkeit ist langsamer als bei Aktionspotenzialen.

Das Variationspotential wird über die nicht lebenden Xylemelemente und deren begleitendes lebendes Xylemparenchym geleitet. Dabei wird es ausgelöst durch hydrostatische Signale oder Druckwellen im Xylem (Pickard, 1973). Die hydraulischen Signale im Xylem wirken vermutlich durch mechanosensitive Ionenkanäle oder Pumpen auf benachbarte lebende Zellen ein (Stankovic et al., 1998).

Dziubinska et al. zeigten 2003, dass das Variationspotenzial das Hauptsignal war, welches die Information beim Versengen eines Blattes auf unverletzte Teile der Pflanze übertrug (Dziubinska et al., 2003).

Li et al. 2016 zeigten an Mais, dass bei Insektenfrass durch die Aktivierung elektrischer Signale eine Akkumulation von Jasmonsäure in entfernten Gewebeteilen induziert werden (Li et al., 2016).

### 2.7.1.4 Hydraulische Signale

Gallé et al. (2015) konnten die Existenz von hydraulischen und elektrischen Signal nach dem Hitzestimulus zeigen. Diese beeinflussen den stomatären Gasaustausch und deuten auf einen Zusammenhang zwischen elektrischen Signalen und Photosynthese sowie Atmung hin (Gallé et al., 2015).

Stahlberg und Cosgrove (1997) untersuchten die Ausbreitung von hydraulischen und elektrischen Signalen in *Pisum sativum* L. (Erbsen) Epikotylen. Sie erhöhten stufenweise den Xylemdruck an der Wurzel intakter Keimlinge und sahen eine Ausbreitung durch die Epikotylachse, während die Amplitude mit dem Abstand von der Druckkammer durch undichtes Xylem abnahm. Entlang der Epikotyloberfläche traten gleichzeitig Depolarisationen mit akropetal zunehmenden Verzögerungszeiten von einer Ausbreitungsgeschwindigkeit

von 20 bis 30 mm pro Minute auf (Stahlberg und Cosgrove, 1997).

## 2.8 Transmissionsmessungen

In Vorversuchen für diese Arbeit wurden Messungen mit Terahertz (THz)-Strahlung durchgeführt. Im elektromagnetischen Spektrum ist der THz-Bereich zwischen der Mikrowellen- und Infrarotstrahlung definiert, meist bei 0,3 THz bis 10 THz (Hübers, 2009). Die THz-Transmission ist ein Maß für den Anteil der Strahlung, die den Detektor erreicht und somit weder absorbiert noch reflektiert wurde. Sie kann maximal 100 % betragen. Da Wasser für eine starke Absorption der Strahlung sorgt (Rønne und Keiding, 2002), ist eine geringere Transmission auf einen höheren Wassergehalt und/oder eine höhere Blattdicke zurückzuführen (Born et al., 2014). Dies konnten Born et al. (2014) an der Variation der Transmission entlang der Blattachse zeigen und begründeten die Messunterschiede durch die Blattdicke/Zusammensetzung.

Bereits 1998 wurde von Koch et al. an *Fagus sylvatica* L. (Rotbuche) und *Ochroma pyramidale* (Balsabaum) vorgestellt, dass mittels Transmissionsprofilen zweidimensionale Dichtekarten von Hölzern erstellt werden können, indem Dichteinhomogenitäten und Strukturdetails bedingt durch Früh- und Spätholz erkennbar sind (Koch et al., 1998).

Im Jahr 2001 wurde eine größere Bandbreite für die biologische Nutzbarkeit der THz-Zeitbereichs-Spektroskopie vorgestellt, sodass neben den bereits erwähnten Dichtekarten, nach Wiederbewässerung ein Anstieg des Wassergehaltes in den Blättern einer unter Trockenstress leidenden Pflanze gemessen werden konnte sowie der Wassertransport in die Pulvini bei *Mimosa pudica* nach Berührung gezeigt wurde (Koch et al., 2001).

Im Jahr 2015 wurden von Gente und Koch in einem Review die verschiedenen Methoden der THz Messung mit Möglichkeiten der Verwendung diskutiert. Die unterschiedlichen Methoden werden im Folgenden kurz vorgestellt (Gente und Koch, 2015):

### (i) THz-Zeitbereichs-Spektroskopie

Dieser Mechanismus erzeugt für jeden eingehenden Strahlungsimpuls (Pulsdauer von ca. 100 fs) einen Terahertz-Impuls. Am Detektor lassen die freien Träger, die durch die Impulse erzeugt werden, einen Photostrom entstehen. Dieser Photostrom wird mit einem phasenempfindlichen Trägerfrequenzverstärker oder einem Transimpedanzverstärker (Strom-Spannungs-Wandler) gemessen. Eine flexiblere und kompaktere Alternative sind fasergekoppelte Messsysteme, bei denen Glasfasern verwendet werden, um die Strahlung zu den photoleitenden Antennen zu leiten. Eine Kombination beider Techniken ist möglich.

Die Methode lässt sich in automatische und mobile Messsysteme unterteilen.



(ii) THz-Dauerwellen-Aufbau

THz-Konfigurationen mit kontinuierlicher Welle verwenden oft Photomixing zur Generierung und Erkennung der THz-Wellen. Das Konzept basiert auf der Überlagerung der Strahlung von zwei Quellen, die leicht gegeneinander verstimmt sind und mithilfe Photomixing-Vorrichtung Terahertz-Strahlung erzeugt.

(iii) THz-Quasi-Zeitbereichs-Spektroskopie

Der Aufbau ist fast identisch mit einem THz-Zeitbereichs-Spektrometer, aber der Femtosekundenlaser wird durch eine kostengünstigere Multimode-Laserdiode ersetzt. Diese erzeugt Strahlung mehrerer verschiedener Phasen zeitgleich.

(iv) sub-THz-Dauerwellen-Aufbau

Der sub-THz-Bereich umfasst den oberen Teil des Mikrowellenspektrums. Dort stehen leistungsfähigere Sender zur Verfügung (Karpowicz et al., 2005). Die längeren Wellenlängen im sub-THz-Bereich verhindern die Fokussierung der Strahlung auf einen kleinen Punkt. Im Gegensatz dazu kann die höhere Leistung Verwendung finden für Messungen an einer größeren Fläche einer Pflanze.

Gente (2016) empfand die THz-Quasi-Zeitbereichs-Spektroskopie für die Wasserstatusüberwachung von Pflanzen (im Freien) als praxistauglich (Gente, 2016).

## 2.9 Thigmomorphogenese

Der Begriff Thigmo-Morphogenese geht auf die griechischen Wörter für Berührung „thigma“ und „morphé“ für Gestalt/ Form sowie „lógos“ für Wort/Lehre/Vernunft/Sinn zurück.

Die Thigmomorphogenese wurde zuerst von Jaffe 1973 als Effekt benannt, welcher durch mechanische berührungsinduzierte Stimulation Veränderungen des Habitus bei Ranken hervorrief (Jaffe, 1973).

Braam stellte 2005 in dem Review „In touch: plant responses to mechanical stimuli“ die unterschiedlichen mechanischen Stimuli und die darauffolgende pflanzliche Reaktion von Karnivoren über sensitive Pflanzen bis zum Wurzelwachstum dar (Braam, 2005).

Als weiterer Aspekt wurden von Gardiner et al. (2016) umfassend der Einfluss von Wind im Bezug auf Pflanzen/Bäume und die daraus hervorgehenden Veränderungen diskutiert. Die Autoren sahen die Anpassungen auf den unterschiedlichen Ebenen für eine „[...] better biochemical performance under wind loading“ (Gardiner et al., 2016). Dabei wirkt Wind bis zu einem gewissen Grad wie ein berührungsinduzierter Reiz, bevor es zu Schäden an den Strukturen kommt.



# KAPITEL 3

---

## Material und Methoden

---

### 3.1 Material

Die verschiedenen Materialien und Methoden, welche für die Experimente eingesetzt wurden, werden nachfolgend aufgeführt. Zusätzliche Ergänzungen im Bezug auf erforderliche Details einzelner Versuchsaufbauten/-durchführungen sind im Kapitel Ergebnisse angegeben, sofern sie hier keine Erwähnung finden.

#### 3.1.1 Pflanzenmaterial

Die folgenden Pflanzenarten wurden verwendet:

**Tabelle 3.1: Verwendete Pflanzenarten.**

Pflanzenart	Samen	Bezug
<i>Acer pseudoplatanus</i> (Ahorn)	Flügelnuss	Arboretum
<i>Glycine max</i> L. (Soja)	Samen	Vermehrung Gewächshaus 2013
<i>Mimosa pudica</i> (Mimose)	Samen	Vermehrung Gewächshaus 2015
<i>Zea mays</i> (Mais)	Korn	Alnatura GmbH

#### 3.1.2 Gewächshaus

Die geographische Lage des Gewächshauses kann über die Eingabe des folgenden Links ermittelt werden: Leuschnerstraße 91; 21031 Hamburg-Bergedorf (<https://www.google.com/maps/@53.5047937,10.2027159,18z>). Die Aussaat und Anzucht der Pflanzen erfolgte in Gewächshauskammer Nummer 7.

### 3.1.3 Substrat

Als Substrat wurde Tonsubstrat Classic Einheitserde (CL ED73) der Firma Hermann Meyer KG bezogen. Laut Hersteller weist das Substrat folgende Inhaltsstoffe auf: Grobe Torfstruktur (240 mg/L N; 330 mg/L P<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (Phosphortrioxid); 480 mg/L K<sub>2</sub>O (Kaliumoxid); 130 mg/L S; 160 mg/L Mg) bestehend aus Weißtorf (schwach zersetzt mit einer hohen Wasserkapazität), Naturton (natürlicher Wasser und Nährstoffspeicher) und Sodontorf (erhöht die Luftkapazität und sorgt für eine langfristige Strukturstabilität). Für die Düngung dienen 1,0 kg/m<sup>3</sup> Nährsalz (14 % N, 16 % P, 18 % K) und 2,0 kg/m<sup>3</sup> Gepac Langzeitdünger (20 % N, 10 % P, 15 % K) mit einer Düngerwirkung über 8 bis 10 Wochen. Von den 20 % Stickstoff im Dünger sind 15 % Methylharnstoff, 2 % Urea und 3 % Ammonium. Phosphat und Kalium liegen als wasserlösliche Verbindungen vor und sind damit sofort für die Pflanze verfügbar. Die chemischen Eigenschaften der CL ED73 sind ein pH von 5,8 (CaCl<sub>2</sub>) und ein Salzgehalt von 2,5 g/L (KCl).

### 3.1.4 Chemikalien

Hersteller der allgemein verwendeten Chemikalien sind folgende Firmen:

- Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
- LI-COR Biosciences GmbH (Bad Homburg)
- Merck KGaA (Darmstadt)
- Sigma-Aldrich (Seelze)
- Thermo Fisher Scientific (Massachusetts, USA)
- Waldeck GmbH & Co. KG (Münster)

Die Tabelle [3.2](#) listet die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Säuren auf.

**Tabelle 3.2: Verwendete Chemikalien und Säuren.**

Chemikalien	Hersteller
Agarose Roti@GAROSE	Carl Roth GmbH
Astrablau FM	Waldeck GmbH & Co. KG
Aquatex	Merck KGaA
Calciumchlorid	Carl Roth GmbH
Ethanol	Carl Roth GmbH
Glycerin $\geq 99,5$ % p.a.	Carl Roth GmbH
Kaliumchlorid	Carl Roth GmbH
2-( <i>N</i> -Morpholino)ethansulfonsäure (MES)	Carl Roth GmbH
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH
Polyethylenglycol (PEG) (Typ 2000)	Carl Roth GmbH
Safranin O	Waldeck GmbH & Co. KG
Salpetersäure (HNO <sub>3</sub> ) 65 % z. A.	CHEMSOLUTE® Th. Greyer
Salzsäure 1 mol/L (HCl)	Carl Roth GmbH
Tris	Carl Roth GmbH
Weinsäure	Merck KGaA
Wolfram(VI)-oxid (WO <sub>3</sub> )	Merck KGaA

Die Nanopure<sup>TM</sup> Wasseraufbereitungsanlage ist von Thermo Scientific und wird mit Barnstead<sup>TM</sup> Nanopure<sup>TM</sup> Verbrauchsmaterialien betrieben. In dieser Arbeit wird das aus der Nanopure-Anlage gewonnene und verwendete Wasser als Nano dest. Wasser bezeichnet.

#### 3.1.4.1 Medien

In dieser Arbeit werden folgenden Medien verwendet:

**Tabelle 3.3: APW Ansatz des Mediums.**

Bestandteil	Konzentration
NaCl	1 mM
KCl	0,1 mM
CaCl <sub>2</sub>	0,1 mM
MES	1 mM
Mit Tris	pH 6,0

Das Seradix Bewurzelungsmedium rooting power I wurde von MB England bezogen.

#### 3.1.5 Hardware und Geräte

Die nachstehende Tabelle 3.4 zeigt die verwendete Hardware und benutzten Geräte:

Tabelle 3.4: Hardware und Geräte.

Gerätename	Hersteller und ggf. Produktnummer	Verwendung
3-Achs-Roboter mit Greifzange 9 V Version (mit TXT Controller)	Fischertechnik 511937	Beweglicher Arm des Roboters
Analysenwaage Adventurer®AX224	OHAUS Europe GmbH	Einwaage für Durckaufschluss
Autosampler ASX-520	CETAC Technologies	Probenzufuhr ICP-OES
Aquarellbleistift	Stabilo	Markierung Stamm-/ Stängelabschnitt
Bildanalyse ZEN Pro 2013	Carl Zeiss Microscopy GmbH	Fotografie der Gewebeschnitte
Digitale Zeitschaltuhr Typ 25100	REV Ritter	Stromzufuhr für Schüttler und Belichtung
Elementaranalyse vario el Cube CHNS	Elementar	Elementaranalyse
Electrometer Dual Microprobe System Duo773	WPI 93105 G10H	digitale Aufzeichnung von intrazellulären Signalen
Einwegklingen DB80 LX	Leica Biosystems	Herstellung von Dünnschnitten am Rotationsmikrotom
Einbettringe (ABS)	VWR	Fixierung Pflanzenmaterial in PEG
Flachbettschreiber Servogor SE460	ABB BBC Goerz Metrawatt	analoge Aufzeichnung von elektrischen Potenzialen
Gehäuse mit Reflektoren	Koninklijke Philips N.V.	Halterung für Leuchtmittel Gewächshaus
Gummischeibe 100 mm	Hagebaumarkt	Fixierung der Fokus Einstellung über die Kurbel des Roboters
Halogen Metalldampf Leistungstrahler (400 W Fc2)	Karl Meister GmbH	Pflanzenbeleuchtung Labor
HH2 Moisture Meter	delta t devices	Messung der Bodenfeuchte
iCAP 6300 Duo	Thermo Fisher Scientific	Optische Emissionsspektrometrie
Kamera AxioCam MRc	Zeiss	Aufnahme von Bildern

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Tabelle 3.4: Fortsetzung: Hardware und Geräte.

Gerätename	Hersteller und ggf. Produktnummer	Verwendung
Kontrolleinheit Easy Control 640	MLS GmbH	Kontrolleinheit für Druckaufschluss
Krokodilklemme	Conrad Elektronik	Befestigung Silberdraht an Becherglas
LED-/LUX Messer MS-200LED	Voltcraft	Bestimmung der Lichtkapazität
Li-6400 XT	LI-COR Biosciences GmbH	Gaswechsellmessungen der Blätter
Metallschale Edelstahl	Lab Tek	Fixierung Pflanzenmaterial in PEG
Micro SD Karte 32 GB SDHC 10	Intensio	Speicherung der Roboterbilder
Mikroskop Axioskop 40 Zeiss	Zeiss	Betrachtung der Dünnschnitte digital
Mikroskop Primo Star	Zeiss	Kontrolle der Dünnschnitte analog
Mikrotommesser 16 cm, Typ C	Reichert-Jung	Herstellung Dünnschnitte am Schlittenmikrotom
Mikrowelle Laborsystem Start	MLS GmbH	Druckaufschluss
Mikrowelle 700 W	MW7809 Severin Elektrogeräte GmbH	Verflüssigung Agar
Multimeter 173 A	Keithley	Messung der extrazellulären Potentiale
Multimeter 2110	Keithley	Messung der intrazellulären Potentiale
Musterbeutelklammer	Herlitz PBS AG	Fixierung der Fokus Einstellung über die Kurbel des Roboters
Natriumdampf Hochdrucklampe NAV-T	Osram Licht AG	Leuchtmittel Gewächshaus
Pipettenzieher PIP 6	Heka Elektronik	Glasmikroelektroden für intrazelluläre Messungen
Polygraph	PolyGraphBio	Temperatursensor

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Tabelle 3.4: Fortsetzung: Hardware und Geräte.

Gerätename	Hersteller und ggf. Produktnummer	Verwendung
Präzisionswaage PCB Waage PCB 60 g	KERN und Sohn GmbH WC073055	Gewichtsbestimmung <60 g
Robotics: Advanced Baukasten	Fischertechnik 533018	Kamera des Roboters
Rotationsmikrotom RM2245 (5° Neigung)	Leica Biosystems	Anfertigung von Dünnschnitten ( $6 \leq 16 \mu\text{m}$ Schnittdicke)
Schüttler	IKA Labortechnik KS 501 digital	Rotation der Pflanzen
Schlittenmikrotom Hyrax S30 (5° Neigung)	Zeiss	Anfertigung von Dünnschnitten ( $\geq 20 \mu\text{m}$ Schnittdicke)
Silberdraht mit Teflon 0,25 mm	AGT1010 WPI (World Precision Instruments, Inc.)	Extrazelluläre Potenzialmessungen
ThetaProbe TYPE ML2x	delta t devices	Bodenfeuchte Sensor
Vario el CUBE CHNS	Elementar	Organische Elementaranalyse
Verstärker Model 750 B	WPI	Verstärkung der elektrischen Potentiale
Waage elektronisch PSE 75 (5 g (0,05 kg – 25 kg)/10 g (25 kg – 75 kg))	Waage G&G	Gewichtsbestimmung >60 g
Wärmeschrank TG120	Heraeus Instruments	Verflüssigung PEG
Wärmeschrank Tv40u	Memmert	Trocknung Probenmaterial
XP-Mikro- und Ultramikrowaagen	Mettler	Einwaage Elementaranalyse
Zinnfolienhüttchen 5 mm x 9 mm	IVA Analysentechnik	Verpackung der Proben der Elementaranalyse
Zerstäuber Mira Mist	Burgener Research Inc	Probenzerstäuber der ICP-OES

### 3.1.6 Software, Online-Programme und Datenbanken

Die Tabelle 3.5 listet die in dieser Arbeit verwendete Software, Online-Programme und Datenbanken auf:



Tabelle 3.5: Software und Internet-Programme.

Programmname	Hersteller	Uniform Resource Locator (URL)	Verwendung
Photoshop CS6 extended	Adope Systems	<a href="http://www.adobe.com">www.adobe.com</a>	Zusammenfügen von Bildern
Filezilla	Tim Kosse und Team	<a href="http://filezilla-project.org">filezilla-project.org</a>	Verwaltung des Dateisystems der Roboters
Fischertechnik Software 4.2.3.	Fischertechnik GmbH	<a href="https://www.fischertechnik.de/de-de/service/downloads/robotics">https://www.fischertechnik.de/de-de/service/downloads/robotics</a>	Steuerung Roboterarm
Python/C Script	Torsten Stuehn	<a href="https://www.ftcommunity.de/ftpedia_ausgaben/ftpedia-2016-1.pdf">https://www.ftcommunity.de/ftpedia_ausgaben/ftpedia-2016-1.pdf</a>	Verwendung Kamera
Googlemaps	Google LLC	<a href="http://www.googlemaps.com/">http://www.googlemaps.com/</a>	Koordinatenbestimmung
Labscribe 2	BIOSEB	<a href="https://www.bioseb.com/bioseb/anglais/default/item_id=809_cat_id=3_LabScribe%202.0.php">https://www.bioseb.com/bioseb/anglais/default/item_id=809_cat_id=3_LabScribe%202.0.php</a>	Aufzeichnung der Messungen der Elektroden
Software Li-6400XT 4.6.3.	LI-COR Biosciences GmbH	<a href="https://www.licor.com/env/products/photosynthesis/LI-6400XT/software_downloads.html">https://www.licor.com/env/products/photosynthesis/LI-6400XT/software_downloads.html</a>	Software des Gaswechsellmessgerätes
LaTeX	Leslie Lamport, LaTeX Projekt Team	<a href="http://www.latex-project.org">www.latex-project.org</a>	Verfassung Dissertationschrift
Office 2010/2016	Microsoft Corporation	<a href="http://www.microsoft.com">www.microsoft.com</a>	Auswertung von Daten und Erstellung von Grafiken
National Center for Biotechnology Information (NCBI)	United States National Library of Medicine (NLM)	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/</a>	Internetdatenbank zur Literaturrecherche
PolyGraph Bio (version 2.1)	PolyGraph.Bio	<a href="http://www.polygraph.bio/#home">http://www.polygraph.bio/#home</a>	Aufzeichnung Temperaturmessungen
Putty.exe	Simon Tatham	<a href="http://www.chiark.greenend.org.uk">www.chiark.greenend.org.uk</a>	Konsolenoberfläche für das Steuerungsscript des Roboters
Python Version 3.6	Python Software Foundation	<a href="http://www.python.org">www.python.org</a>	Programmierung und Modifikation des Roboterscriptes
ResearchGate	Researchgate GmbH	<a href="http://www.researchgate.net">www.researchgate.net</a>	Datenbank Wissenschaftlernetzwerk
Windows Movie Maker	Microsoft	<a href="https://www.microsoft.com/de-de">https://www.microsoft.com/de-de</a>	Zusammenfügen von Bildern zu einer Videosequenz
ZENPro 2012 (blue edition Service Pack 12)	Carl Zeiss AG	<a href="http://www.zeiss.de">www.zeiss.de</a>	Aufnahme u. Vermessung von Gewebeschnitten

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Pflanzenmaterial und Kultivierung

Die Aussaat der Samen von *Zea mays*, *Mimosa pudica* und *Glycine max L.* wurde in Einheitserde (siehe Kapitel 3.1.3) im Gewächshaus (Kapitel 3.1.2) vorgenommen. Die Vereinzelung der Keimlinge kam durch Pikieren in Töpfe zustande. Zur Bewässerung diente das Gießwasser des Gewächshauses, welches aus Regenwasser gewonnen und in einer Zisterne gesammelt wird. Die Kultivierung erfolgte unter Langtagbedingungen über die Vegetationsperiode (14 h Licht (25°C) von 6 Uhr bis 20 Uhr und 10 h Dunkelheit (18°C) von 20 Uhr bis 6 Uhr). Die relative Feuchte lag über den Tag im Mittel bei 78,5 %. Zur Beleuchtung diente eine Natriumdampfhochdrucklampe (141 lm/W) mit Phillips Reflektorgehäuse, zusätzlich fällt auch die Sonneneinstrahlung in die Gewächshauskammern. Diese wird automatisch reguliert. Sobald ein Wert von 40.000 Lux überschritten wird, werden Schattierungen ausgefahren, um ein Überhitzen der Kammern zu unterbinden. Für die Signalverarbeitungsversuche unterschiedlicher Reize waren die *Zea mays* Pflanzen in 7,5 L Töpfe gepflanzt.

### 3.2.2 Rotierende Bewegung der Pflanzen

Die rotierende Bewegung wurde durch den Schüttler (siehe Tabelle 3.4) für jeweils 15 Minuten bei 136 *rounds per minute* (rpm) (entspricht  $3,04 \text{ m s}^{-2}$ ) um 8 Uhr, 10 Uhr, 12 Uhr, 14 Uhr, 16 Uhr und 18 Uhr nach MEZ induziert. Bei *Zea mays* ergab sich eine Drehzahl von 132 rpm ( $2,86 \text{ m s}^{-2}$ ). Die Anzucht der Kontrollgruppe erfolgte im gleichem Abstand zur Lichtquelle im Gewächshaus, demgegenüber kam es zu keiner Veränderung in ihrer jeweiligen Exposition (s. Abb. 3.1). Zusätzlich befand diese sich auf einem separaten Tisch, um zu verhindern, dass minimale übertragene Vibrationen der Rotation zu verfälschenden Ergebnissen führen. Letztendlich wurden die Kontrollpflanzen gegenüber den rotierten Individuen in selber Höhe ( $26,5 \text{ cm} \pm 0,5 \text{ cm}$ ) aufgebaut (Abb. 3.2). Über die Versuchsdauer hinweg wurden Veränderungen des Habitus (genauer Wuchs in die Höhe und der Stammdurchmesser der Pflanzen) gemessen und durch Fotografien dokumentiert.

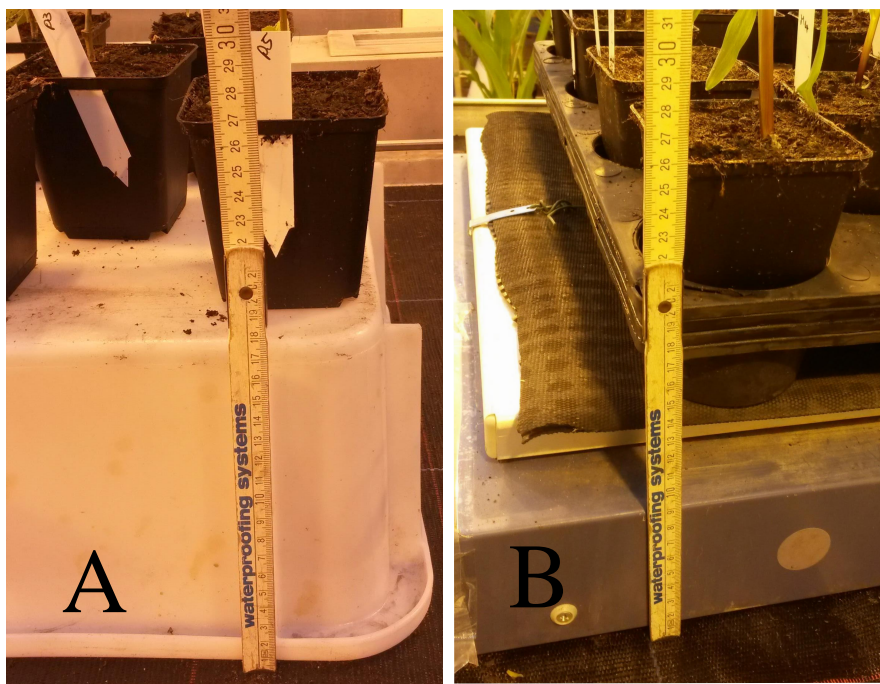
Im Folgenden ist die jeweilige Versuchsdauer in aufsteigender Reihenfolge dargestellt:

- *Zea mays* 4 Wochen
- *Mimosa pudica* 2016 9,5 Wochen
- *Mimosa pudica* 2015 10 Wochen
- *Acer pseudoplatanus* 13 Wochen

Nach Beendigung des Versuchszeitraumes wurde untersucht, ob sich anatomische Veränderungen durch die Behandlung ergeben hatten.



**Abbildung 3.1:** Aufbau des Rotationsversuches. Beispielhaft ist der Aufbau der *Mimosa pudica* Pflanzen des Rotationsversuches im Gewächshaus abgebildet. Links sind die rotierten Individuen dargestellt. Rechts ist die Kontrollgruppe, zu sehen.



**Abbildung 3.2:** Messung der Topfhöhen im Rotationsversuch. (A) Kontrollaufbau, beispielhaft an *Acer*. (B) Töpfe im Schüttler (Tab. 3.4), beispielhaft an *Mays*.

### 3.2.3 Ernte

Für die Untersuchungen des Wurzelballens war ein Auswaschen unabdingbar, um Erdreste zu entfernen und anschließend die Wurzel vom oberirdischen Material abzutrennen. Dabei wurden die Wurzel und das oberirdische Material, im Folgenden als Spross bezeichnet, separat gewogen.

Die untersten 3 cm des Stängels/Stammes über der Erde wurden beidseitig durchtrennt. Dieses zuvor gewonnene Stück fand für die Messung des Stängel-/Stammdurchmessers Verwendung, welche in der Höhe von 1,5 cm erfolgte. Zur Aufbewahrung wurden die Stängel-/Stammabschnitte in 70%igen Ethanol konserviert.

#### 3.2.3.1 Darren

Die Trocknung der restlichen Pflanzenteile von *Zea mays* erfolgte bei 104°C für eine Stunde, danach wurden diese zum Abkühlen ca. 10 Minuten in einem Exsikkator stehen gelassen und anschließend gewogen, um das Trockengewicht zu bestimmen.

### 3.2.4 Präparation von pflanzlichem Gewebe

Die Präparation der Stängel-/Stammstücke ist nachfolgend erläutert und war entscheidend, um Aussagen über einen Einfluss des jeweiligen Reizes auf anatomischer und damit morphologischer Ebene treffen zu können.

#### 3.2.4.1 Einbettung der Proben in PEG

Das Stängel-/Stammstück der Pflanzen wurden an beiden Enden mit glatten Schnitten versehen. Für die spätere Identifizierung der Basis erfolgte die Markierung mittels eines Aquarellbleistiftes auf entgegengesetzter Seite.

In ein 120 mL Becherglas wurde PEG als Feststoff (Flocken) gegeben und in einem Wärmeschrank (s. Tab. 3.4) bei 58°C zur Verflüssigung gebracht. Die Verdünnung des flüssigen Polyethylenglykols wurde im Verhältnis 1:4 mit Nano dest. Wasser vorgenommen. Die Proben wurden in das Gemisch gegeben und 2 – 3 Tage im Wärmeschrank aufbewahrt, sodass das PEG in diesem Zeitraum in das pflanzliche Gewebe eindrang. Es wurde gewartet, bis der H<sub>2</sub>O Anteil verdunstete. Die darauffolgende Lagerung in unverdünntem PEG betrug mindestens 24 h, um dafür zu sorgen, dass das Gewebe vollständig mit PEG durchtränkt und das restliche Wasser verdrängt worden ist. Die Einbettung erfolgte mittels Metallschalen und Einbettringen. Zunächst wurde ein Tropfen flüssiges PEG in die Metallschale gegeben und die Probe aufrecht mit der Basis nach unten ausgerichtet. Anschließend wurde der Einbettring aufgesetzt und die Metallschale vollständig mit PEG

aufgefüllt. Über den Zeitraum des Aushärtens musste öfter PEG nachgefüllt werden, da sonst über der eingebetteten Probe ein Loch entstand. Die Aushärtung der Probe in PEG wurde über Nacht vorgenommen. Danach wurde der PEG Block mit der Probe aus der Metallschale durch leichtes Erhitzen herausgelöst. Die Aufbewahrung fand im Kühlschrank statt, da das PEG nicht thermostabil ist. Das bedeutet, bei erneuter Erhitzung kommt es wieder zur Verflüssigung.

#### 3.2.4.2 Farbstoff Herstellung

Farbstoffe können auf alkoholischer/ethanolischer oder wässriger Basis hergestellt werden. Abhängig davon auf welcher Basis die Färbemittel angesetzt werden, kann im Anschluss daran, das gefärbte Präparat ausgewaschen und eingebettet werden. Im Folgenden sind die verschiedenen Ansätze kurz erklärt:

Das Färben mittels 1 % Safranin erlaubt es, verholzte Strukturen in einem roten Farbton darzustellen. Für die alkoholische Lösung des Safranins wird 1%iges Safranin in 60%igen Ethanol gelöst. Eventuell ist ein Erhitzen unter Verwendung einer Heizplatte und eines Magnetührstabes auf 30°C bis maximal 40°C notwendig, um die Löslichkeit zu erhöhen. Bei einem wässrigen Ansatz lief die Herstellung analog mit der Ausnahme ab, dass anstatt Ethanol Nano dest. Wasser verwendet wird.

Die Färbung mit 0,5%igen Astrablau stellt nicht verholzte Zellen blau dar. Für alkoholisches Astrablau werden 0,5%iges Astrablau und 2%ige Weinsäure ( $C_4H_6O_6$ ) in 60%igen Ethanol gelöst. Dafür ist zunächst das Lösen von 2 % Weinsäure in Nano dest. Wasser notwendig. Zu der gelösten Weinsäure wird 0,5%iges Astrablau gegeben und dabei auf 30 – 40°C erhitzt. Nach dem Abkühlen wird 99,6%iges Ethanol hinzugegeben bis eine 60%ige Ethanollösung vorliegt. Diese Lösung wurde 10 Minuten gerührt und im Anschluss filtriert. Die wässrige Lösung von 0,5%igen Astrablau wird ohne Weinsäure hergestellt.

Eine Lagerung der Farbstoffe ist im Kühlschrank möglich. Vor der Benutzung von gelagerten Farbstoffen mussten diese immer filtriert werden, um ungelöste Farbrückstände zu entfernen.

#### 3.2.4.3 Schneiden und Färben von Präparaten

Das Einspannen der in PEG eingebetteten Proben erfolgte in das Schlittenmikrotom Hyrax 305 (Zeiss). Bei einem Schlittenmikrotom wird das Messer zur Probe geführt und gleitet wie ein Schlitten darüber, sodass die Probe nach jedem Schnitt um die eigestellte Schnittdicke stufenweise hinausgesetzt wird, um den darauffolgenden Schnitt in derselben Dicke zu produzieren.

Zunächst musste das Messer an die Probe angenähert werden und das überflüssige PEG

entfernt werden, danach wurde die Probe plan geschnitten, um möglichst einen vollständigen Querschnitt zu erhalten. Vollständige Schnitte waren mit einer Schnittdicke von 20  $\mu\text{m}$  möglich. Bei dem Rotationsmikrotom RM2245 (LEICA) war eine Schnittdicke von bis zu 6  $\mu\text{m}$  möglich. Im Gegensatz zum Schlittenmikrotom wird beim Rotationsmikrotom die Probe zum Messer geführt und gleitet in einer Rotationsbewegung über das Messer. Anschließend wird auch hier die Probe mit der eingestellten Schnittdicke nach vorne geschoben, um beim darauffolgenden Schnitt eine identische Schnittdicke zu haben. Dabei gilt der Grundsatz: Je dünner der Schnitt ist, desto wahrscheinlicher wurde nur eine Zellebene abgetrennt. Dies wiederum ermöglicht an der Bildanalyse bei einer höheren Vergrößerung einen besseren Schärfeeindruck.

Teilweise wurden die Schnitte mit Hilfe eines Stücks tesafilm®Eco & Clear Transparent (Klebeband) genommen. Durch die Körperwärme der Finger konnte der auf die Probe und PEG gebrachte tesafilm® leicht angewärmt werden und haften bleiben. Beim Schneiden mit dem Schlittenmikrotom wurde dann der tesafilm® mittels einer Pinzette angehoben und der Schnitt mit tesafilm® und darunterliegender Zellschicht genommen. Das Ganze wurde in eine mit Nano dest. Wasser gefüllte Petrischale aus Glas überführt. In diesem löste sich das wasserlösliche PEG auf. Teilweise war es möglich, die Schnitte von dem tesafilm® zu trennen, da das Färben auf diesem sich als unpraktisch herausstellte. Der tesafilm® nahm die Farbe mit auf und konnte nur unvollständig ausgewaschen werden.

Ohne bzw. mit tesafilm® wurde in Augengläschen nacheinander gefärbt:

Zunächst erfolgte eine 6-minütige Färbung der Schnitte in 0,5%iger Astrablau-Färbelösung. Danach wurde der Schnitt 2 – 3-mal in einer Petrischale aus Glas ausgewaschen, bis das Präparat keine Farbschlieren mehr zieht. Bei einem Farbstoff auf alkoholischer Basis wird zum Auswaschen immer 70%iger Ethanol verwendet. Bei Farbstoffen auf wässriger Basis wird mit Nano dest. Wasser ausgewaschen. Nach der Astrablaufärbung erfolgte die 1%ige Safraninfärbung für 2 Minuten. Dabei wird ebenso wie oben beschrieben im Anschluss ausgewaschen. Als letzter Schritt erfolgt ein 10-minütiger Waschschrift in 99,6 % Ethanol bei alkoholischer Färbung bzw. Nano dest. Wasser bei wässriger Färbung.

Beim Schneiden mit dem Rotationsmikrotom entstanden sogenannte Serienschnitte, die als Band mit einer Pinzette in eine Petrischale aus Glas mit Nano dest. Wasser überführt wurden. Ein komplett erscheinender Schnitt konnte mittels Anfeuchten eines weichen Pinsels und der Oberfläche des Objektträgers auf den Objektträger aus dem Wasserbad aufgezogen werden. Nach Abtupfen des überschüssigen Wassers wurde in diesem Fall für eine Minute mit einer kombinierten Safranin-Astrablaufärbelösung direkt auf dem Objektträger gefärbt, da die Schnitte mit einer Dicke von 6  $\mu\text{m}$  so dünn waren, dass eine Überführung in mehrere Bäder nur zu Gewebeschäden geführt hätten. Nach dem Färben wurde die Lösung mit einer Plastik-Pasteurpipette abgesaugt und das Präparat wiederholt auf dem Objektträger gewaschen.

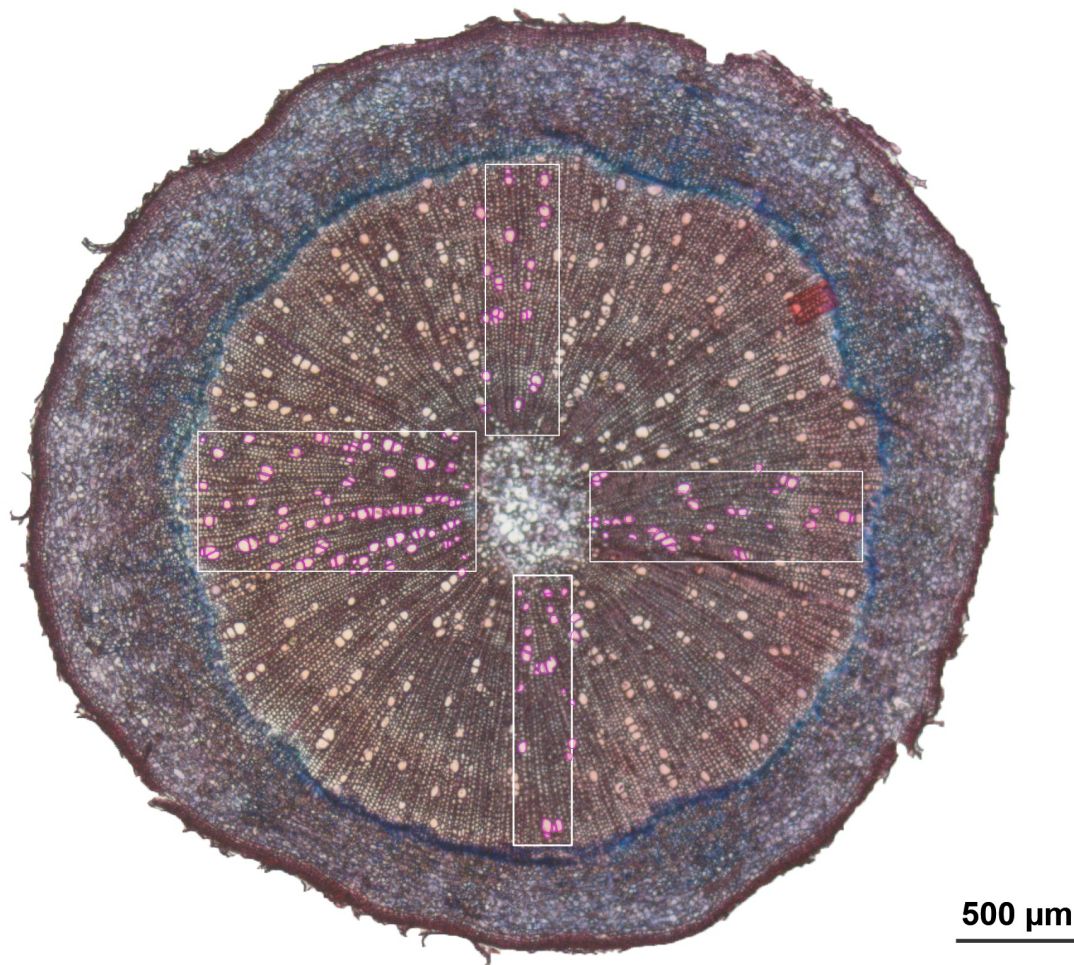
Nach der jeweiligen Färbung erfolgte die Einbettung mit Deckgläschen, auf die ein streifen Glycerin (für eine Präparationsdauer von bis zu 5 Jahren) oder Aquatex (für eine Präparationsdauer von bis zu 6 Monaten) gegeben wurde. Um ein luftblasenfreies Präparat zu erzeugen, ist es notwendig, das Deckgläschen mit einer Lanzierpinzette zu führen. Die mit Aquatex eingebetteten Präparate wurden über Nacht getrocknet und mit einem Metallgewicht beschwert, um überschüssige Luft zu entfernen.

#### 3.2.4.4 Bildanalyse für Fotografie der Präparate

Das Programm ZENPro 2012 (Tab. 3.5) dient dazu, Bilder der zuvor angefertigten Schnitte aufzunehmen. Die Software erlaubt es, einen Maßstab über die verwendete Vergrößerung in das Bild einzufügen. Verschiedene Instrumente stehen für die Vermessung der anatomischen Besonderheiten zur Verfügung, von denen die jeweilige Größe im  $\mu\text{m}$ -Bereich über den vorher festgelegten Maßstab ausgelesen werden kann. Bei den Querschnitten wurden Rechtecke eingefügt. Diese lagen in allen vier Himmelsrichtungen ausgerichtet um den Zentralzylinder. Die Gefäße innerhalb eines Rechtecks wurden vermessen sowie die Gefäße, die oben und rechts durch das Rechteck geschnitten worden waren. Ziel für die Vermessung zweier geschnittenen Gefäßseiten ist, keine verschobene durchschnittliche Gefäßgröße am Ende zu erhalten und rechnerisch alle innen liegenden Gefäße zu vermessen (Abb. 3.3). Aus den gewonnenen Ergebnissen kann die durchschnittliche Gefäßgröße und -dichte berechnet werden (siehe Kapitel 3.2.13.1).

Bei einem sehr großen Durchmesser des Stammes und/oder der Verwendung einer hohen Vergrößerung ergab sich, dass durch eine einzelne Aufnahme es nicht möglich war, den gesamten Querschnitt abzubilden. Deshalb wurden mehrere Aufnahmen mit überlappenden Bildausschnitten aufgenommen und mittels Photoshop zu einem Bild zusammengefügt.





**Abbildung 3.3: Gefäßvermessung am Beispiel einer *Mimosa pudica* Kontrollpflanze.** Abgebildet ist die Vermessung eines Schnittes einer gefärbter *Mimosa pudica* Kontrollprobe. In weiß sind die Rechtecke für die Flächen der Vermessung und in pink die vermessenen Gefäße dargestellt. Die Aufnahme der Bilder erfolgte mit 2,5-facher Vergrößerung (Schnittdicke 20  $\mu\text{m}$ ).

### 3.2.5 Elektrophysiologische Potenzialmessungen von pflanzlichen Geweben

Die Potenzialmessungen erfolgten ausschließlich auf oder in den Blättern der jeweiligen Spezies, um die elektrische Erregbarkeit der Pflanze durch den entsprechenden Reiz nachzuweisen.

#### 3.2.5.1 Chlorierung von Silberdraht für extrazelluläre Messungen

Für die extrazellulären Messungen wurde zunächst Silberdraht chloriert. Der Silberdraht ist mit Teflon beschichtet, diese Beschichtung muss am Draht in einem Bereich von ca. 10 cm entfernt werden. Im Anschluss konnten zwei Silberdrähte mit Krokodilklemmen an einem



Becherglas, gefüllt mit 1 M Salzsäure (HCl), befestigt werden. An die Metallklemmen wird eine 1 V Spannung für 5 bis 15 Minuten angelegt. Durch Anlagern der negativ geladenen Chlorid-Ionen wird die Anode des Silberdrahtes chloriert.

#### 3.2.5.2 Potenzialmessungen extrazellulär

Für die extrazellulären Messungen konnte in APW (Tab. 3.3) 10%iger Agar (Tab 3.2), durch Erhitzen gelöst, verwendet werden. In diesem wurde nach dem Abkühlen, bevor eine vollständige Aushärtung stattfand, der chlorierte Silberdraht aufgebracht, welcher mit dem Verstärker verbunden war und auf die Blattoberfläche eingebettet. Über eine Zeitschaltuhr erfolgte eine tägl. 14-stündige Belichtungsregulierung von 6 Uhr bis 20 Uhr, um analoge Wachstumsbedingungen wie im Gewächshaus zu schaffen. Hierzu fand ein 117 Lm/W Halogenmetalldampfleistungsstrahler Verwendung. Die Temperatur wurde bei 25°C gehalten. Zur Aufzeichnung der Messdaten diente ein analoges System, bestehend aus einem Flachbrettschreiber, Verstärker und Multimeter (siehe Tab. 3.4). Die Schreibgeschwindigkeit des Flachbrettschreibers wurde mit 1 cm/h und der Messbereich der Strommspannung bei 500 mV definiert. Beim Messstart lag das Ruhepotenzial bei  $\pm 0$  mV.

Die extrazellulären Messungen des circadianen Rhythmus der trockengestressten *Zea mays* Pflanzen liefen über zwei Tage, um zeigen zu können, dass immer noch eine Reaktion auf die Lichtveränderungen initiiert werden konnte und noch keine letalen Bedingungen vorherrschten.

#### 3.2.5.3 Mikroelektroden Herstellung für intrazelluläre Messungen

Für die intrazellularen Messungen mussten Glasmikroelektroden hergestellt werden. Von 106 cm langen Glaskapillaren mit einem Innendurchmesser von 0,75 mm (Außendurchmesser: 1,5 mm) wurde mittels einer Nagelfeile ein 10 cm langes Stück abgetrennt. Diese konnten in den temperatur-kontrollierten Pipettenzieher PIP 6 eingesetzt werden. Über die Erhitzung des Heizfilamentes und die wirkenden Gewichte entstehen Mikroelektroden mit einem Spitzendurchmesser von 2  $\mu$ m. Als Parameter für die Heizstufen wurde für A = 6,5 mm (entspricht 1381°C) und B = 4,2 mm (entspricht 746°C) eingestellt.

#### 3.2.5.4 Potenzialmessungen intrazellulär

Für die intrazellularen Messungen fand das digitale System von WPI (Duo 773) (s. Tab. 3.4) verbunden mit einem Computer Verwendung. Bei der Präparation der Elektroden wurden Elektrodenhalter und die zuvor selbstgezogenen Mikroelektroden (Kapitel 3.2.5.3) mittels einer Spritze mit 500 mM KCl befüllt. Die befüllten Mikroelektroden wurden luftblasenfrei in den Elektrodenhalter gebracht und mittels Unterdruck verschraubt. Anschließend wurden ein oder zwei Probenhalter an das Duo773 angeschlossen und die Mikroelektroden mit

der Spitze in die Mittelrippe der jeweiligen Art eingestochen. Bei der Verwendung von nur einer Elektrode des digitalen Systems wurde die andere an das zuvor beschriebene analoge System angeschlossen (Kapitel 3.2.5.2). Die Platzierung der zweiten Elektroden erfolgte in einem Abstand zur ersten von  $5 \text{ cm} \pm 1 \text{ cm}$ . Nach dem Einstechen sollte ein Potenzial von  $-80$  bis  $-200 \text{ mV}$  für die Positionierung im Phloem angezeigt werden (Fromm und Lautner, 2007). Wenn beide Elektroden ein konstantes Signal gaben, fand eine Reizung nach frühestens 10 Minuten statt.

Bei den *Zea mays* Pflanzen wurden die Elektroden in der Mittelrippe des jeweils dritten Blattes von oben in einem Abstand von  $9 \text{ cm} \pm 2 \text{ cm}$  zur Blattspitze platziert. Dieses dient, ebenso wie die Verwendung von gleich großen Pflanzen, für ein Angleichen des Entwicklungsstadiums der Pflanzen bzw. der gemessenen Blätter.

### 3.2.6 Temperaturmessungen an der Blattoberfläche

Um zu überprüfen, ob der Hitzestimulus eine signifikante Erwärmung der Messelektrode und damit eine Beeinflussung der Ergebnisse zu Folge hatte, wurde der Temperatursensor eines Polygraphen (PolyGraphBio, version 2.1) (Tab. 3.4) auf der Blattoberfläche angebracht. Für die Messung eines eventuellen Temperaturverlaufes erfolgte die Verringerung des Abstandes vom Temperatursensor zum Hitzestimulus von maximal  $9 \text{ cm}$  bis zu  $1 \text{ cm}$  (siehe Abb. 3.4). Dafür fand jeweils eine Verringerung in  $1 \text{ cm}$  Schritten an einem neuen Blatt einer neuen Pflanze statt. Die  $9 \text{ cm}$  Abstand entsprachen dem mittleren Abstand der Mikroelektroden zum Hitzestimulus. Die Messungen wurden mindestens 10 Minuten vor der Hitzestimulation der Blattspitze begonnen. Gleichzeitig wurde die Temperatur der APW Lösung, in dem sich die Referenzelektroden befanden, mit einem Thermometer gemessen.

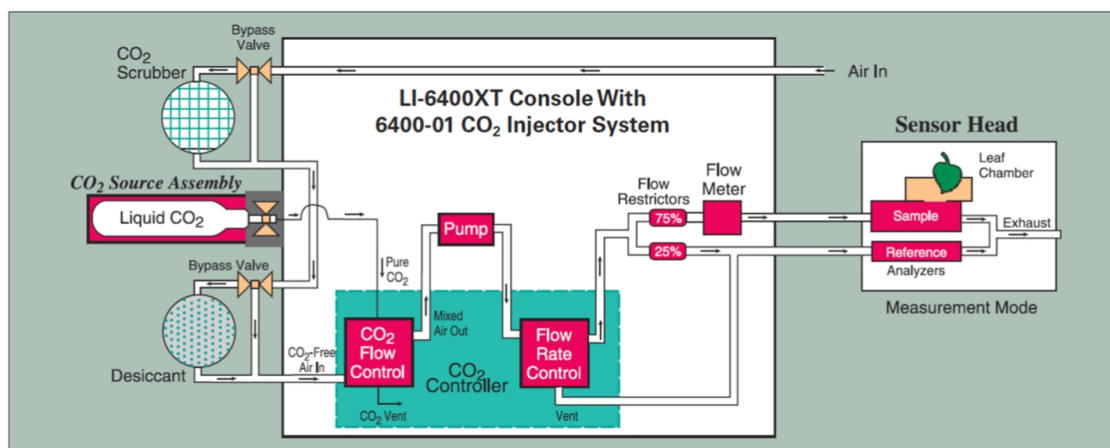


**Abbildung 3.4: Beispielhafte Darstellung der Temperaturmessung.** Abgebildet ist die Temperaturmessung nach Hitzestimulus in 1 cm Entfernung an einem *Zea mays* Blatt.

### 3.2.7 Gaswechsellmessungen

Die Gaswechsellmessungen fanden mit dem tragbaren Gaswechsellmessgerät Li-6400 XT (LI-COR Biosciences GmbH) (Tab. 3.4) statt, welches ein geschlossenes System darstellt (siehe Abb. 3.5). Dieses besteht aus einem Infrarot Gasanalysator (IRGA)-Messkopf mit Lichtquelle und Datenlogger. Die Kalibrierung der Parameter erfolgte nach dem Aufwärmen auf 400 *parts per million* (ppm) CO<sub>2</sub>, 1000  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  photosynthetisch aktive Radiation (PAR) (10 % blaues Licht). Die in der Messkammer vorhandene Luftfeuchtigkeit und Temperatur wurde genutzt, um den realen Bedingungen zu entsprechen und somit keine zu starken Veränderungen der Atmosphäre während der Messungen hervorzurufen. Um für jede Messung die gleiche, definierte Atmosphäre zu schaffen, wurde die Einstellung der genannten Parameter wiederverwendet. Im Gerät werden über Wellenlängen im infraroten Bereich die CO<sub>2</sub>- und H<sub>2</sub>O-Konzentration des Proben- und Referenzstromes gemessen. Aus der Differenz vom Proben- zum Referenzstrom werden die Werte für die Netto CO<sub>2</sub> Aufnahme, Transpiration, stomatäre Leitfähigkeit und interzelluläre CO<sub>2</sub>-Konzentration ermittelt. Aus der Netto CO<sub>2</sub> Aufnahme wiederum wird vom Gerät die Photosyntheseleistung unter Einbeziehung der Fläche der Kammer (6 cm<sup>2</sup>) und der Stomataverteilung (einseitig oder beidseitig) berechnet. Für die molare Strömungsgeschwindigkeit der Luft, die in die Blattkammer eintritt, wurde eine Frequenz von 500  $\mu \text{mol s}^{-1}$  eingestellt. Sobald die eingestellten Werte erreicht waren, erfolgte eine Anpassung der

Werte des Referenzstroms auf den Probenstrom zum Eichen der Parameter. Im Anschluss konnte das Blatt für die Messung in den Messkopf eingespannt werden. Während das Blatt in der Messkammer eingespannt ist und beleuchtet wird, findet im Photosyntheseprozess kontinuierlich die Aufnahme von  $\text{CO}_2$  durch die Stomata und die Abgabe von  $\text{H}_2\text{O}$  als Wasserdampf statt. Für die Umwälzung dieser Gase sind im IRGA-Messkopf Ventilatoren installiert. Für beide Ströme wird in dem Gasgemisch die Konzentration vor Eintreffen in der Messkammer mit Hilfe eines Trocknungsmittels ( $\geq 98\%$   $\text{CaSO}_4$  und  $< 2\%$   $\text{CoSO}_4$ ) zur Regulierung der Luftfeuchtigkeit eingestellt. Analog dazu wird für die  $\text{CO}_2$ -Konzentration ein Absorber ( $> 75\%$   $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ,  $< 4\%$   $\text{NaOH}$  und  $< 0,1\%$  Kristallviolett ( $\text{C}_{25}\text{N}_3\text{H}_{30}\text{Cl}$ ) genutzt.



**Abbildung 3.5: Schematische Darstellung des Funktionsprinzips des Li-6400 XT.** Mittels kleiner Pfeile ist der Luftstrom durch das Gerät bis in den Messkopf dargestellt (LI-COR, 2016).

Für die Adaption des Blattes an die Messbedingungen innerhalb der Kammer wurde wenigstens 3 Minuten gewartet, bevor die Aufzeichnung der Messdaten begann. Vor der Reizsetzung waren es dann im Anschluss zusätzlich mindestens 10 Minuten. Die Aufzeichnung der Messwerte durch das Li-6400 XT erfolgte kontinuierlich als ein Mittelwert aus 10 Sekunden für einen Messpunkt. Die generierten tabellarischen Messwerte wurden im Speicher des Gerätes aufbewahrt und zu einem späteren Zeitpunkt auf einen tragbaren Computer ausgelesen. Das erstellte Dateiformat ist mit dem von Microsoft Excel 2016 kompatibel und konnte damit weiterverarbeitet werden.

### 3.2.8 Darstellung des Wachstums mittels eines automatisierten Bildgebungsverfahrens

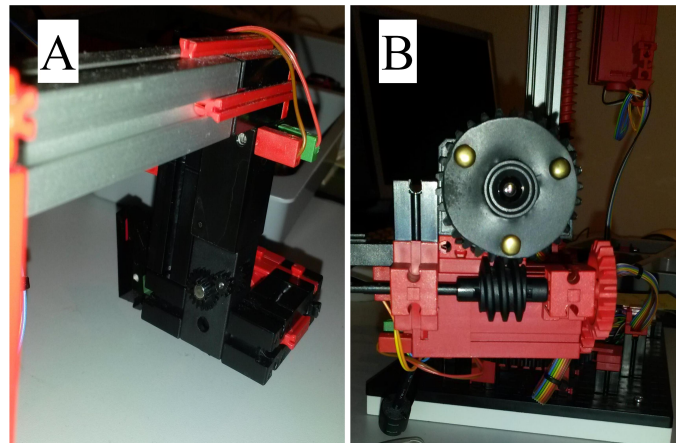
Als Grundlage für das automatisierte Bildgebungsverfahren diente die Dissertation von A. Neugebauer von 2002, welche zusätzlich 2015 von W. Engelmann als englische Übersetzung bei ResearchGate veröffentlicht wurde (Neugebauer, 2002). In der Arbeit wurde von 15

*Arabidopsis thaliana* (Ackerschmalwand) Samen im 4 Minuten Abstand mittels eines umgebauten Druckers ein Bild aufgenommen, um die Keimung und den Wachstumsfortschritt sowie circadiane Bewegungen zu untersuchen. Unter anderem wurden Phytohormone verwendet, um deren Einfluss zu zeigen. Als Marker dienten strukturbedingte Verfärbungen im Stängel der Keimlinge, die eine zeitliche Zuordnung zum Wachstumsfortschritt möglich machten. Aus den gewonnenen Bildern wurden kurze Videosequenzen erstellt und ein Programm geschrieben, um die Bewegungen als Grafik darstellen und auswerten zu können.

Für die hier vorliegende Arbeit wurde sich der technische Fortschritt der letzten Jahre zu Nutze gemacht, weshalb für ein bildgebendes automatisiertes Verfahren ein Fischertechnik 3-Achs-Roboter mit Greifzange und eine USB-Kamera von Fischertechnik verwendet wurde (Tab. 3.4). Die Aufnahme der Bilder erfolgte von der Kontroll- und Versuchsgruppe. Integriert wurde eine USB-Kamera, die bis zu 7 Farben erkennen kann. Es wäre möglich gewesen, Pflanzen mit Farbpunkten zu markieren, damit diese von der Kamera mit Roboterarm anvisiert zum Fokussieren des Bildes genutzt werden können. Dies war jedoch nicht nötig, da eine gute Bildschärfe durch den später dargestellten Aufbau mit weißem Hintergrund, entstand.

Dem 3-Achs-Roboter wurde zunächst der Greifarm entnommen und stattdessen die Kamera montiert (Abb. 3.6 A). Da die USB-Kamera noch nicht über die von Fischertechnik mitgelieferte Software gesteuert werden konnte, wurde, aufbauend auf ein Python-Script zur Nutzung der Kamera (Stuehn, 2016), ebenfalls in der Programmiersprache Python das Skript zur Steuerung des Roboterarmes und der Fokussierung der Kamera geschrieben (Tab. 3.5) (siehe Anhang A.2). Stuehn (2016) zeigte ebenso eine Möglichkeit der Befestigung der Fokuseinstellung über die Kurbel des Roboters mittels Papier. Diese wurde modifiziert und durch zwei Gummischeiben und Musterbeutelklammern ersetzt (Abb. 3.6 B).

Die Software für den Roboter wurde ergänzend programmiert, sodass die Bewegung in der X- und Z-Achse ( $180^\circ$ ) wieder möglich war. Jede Bewegungsrichtung ist an der einen Seite durch einen Taster begrenzt, der betätigt wird, sobald das Maximum erreicht ist und an der anderen Seite durch eine eingestellte Strecke. Als nächstes musste ein Abschnitt geschrieben werden, in dem der Arm zur Ausgangsposition fährt (Taster gedrückt) und dort von vorne beginnt, wenn das Programm abstürzen sollte. Danach wurde die Z-Achsen Bewegung wieder implementiert. Eine Bewegung in der Y-Achse war nicht nötig, da dies über den Fokus erfolgt. Die detaillierte Beschreibung der Fokusprogrammierung ist im Kapitel 4.2.7 dargestellt.

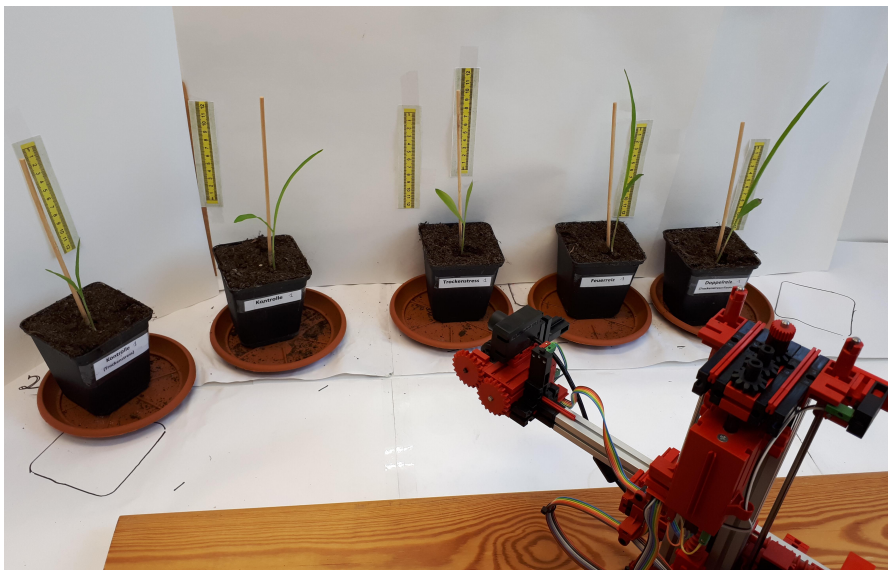


**Abbildung 3.6: Aufbau des Roboterarms und der Kamera.** (A) Roboterarm ohne Greifzange; (B) Frontansicht Roboter mit Kamera und Fokusapparat.

Der letztendlich verwendete Aufbau ist in [Abbildung 3.7](#) dargestellt. Es wurden fünf Pflanzen von rechts nach links fotografiert und vermessen. Jeweils eine Pflanze für den Hitzestimulus, die Wiederbewässerung nach Trockenstress, der gleichzeitigen Stimulation sowie eine positive und negative Kontrolle. Nachdem die letzte Pflanze in der Reihe fotografiert wurde, wurde eine Schleife eingebaut, sodass das Programm pausiert, bis es wieder von vorne gestartet wird ([Anhang A.3](#)). Zu Beginn wurde alle 5 Minuten als Test ein Bild generiert. Später alle 20 Minuten im Zeitraum von 10 bis 15 Uhr. Nach dem Reizgeben erfolgte die Bildaufnahme permanent bzw. so häufig wie durch das Programm möglich.

Zusätzlich wurden die Pflanzen über den gesamten Zeitraum täglich manuell mit einem Lineal vermessen, um den Zuwachs zu detektieren.





**Abbildung 3.7: Automatisiertes Bildgebungsverfahren.** Versuchsarten des *Zea mays* von links nach rechts: negative Kontrolle, positive Kontrolle, wiederbewässerte Pflanzen nach Trockenstress, Hitzestimulus und simultane Stimulation.

### 3.2.9 Transmissionsmessungen im Terahertz Bereich

An der Philipps-Universität Marburg wurden Versuche gemeinsam mit Dr. Ralf Gente (Institut für experimentelle Halbleiterphysik) vorgenommen, in denen bei trockengestressten *Glycine max L.* Pflanzen Transmissionsmessungen mit Terahertz (THz)-Strahlung durchgeführt wurden (Abb. 3.8). Das System erfasst die Änderung des Wassergehaltes/der absoluten Wassermenge durch einen THz-Strahlung. Je weniger Wasser im Gewebe vorhanden ist, desto höher ist die Transmission, da Wasser THz-Strahlung absorbiert. Sobald die Transmission offensichtlich anstieg (das Blatt sich dem Welkepunkt näherte) wurde wiederbewässert. Im Anschluss daran erfolgte der Hitzestimulus in der Mitte der geschätzten Transmissionsabnahme (erkennbare Wasseraufnahme des Gewebes). Während der Messung fährt die Messapparatur wiederholt vor und zurück, um Leerwerte in der Luft als Referenz zu messen.

Der Messbereich der Strahlung betrug 15 mm. Dies hat zur Folge, dass beispielsweise bei einem Hitzestimulus Wasser der umliegenden Zellen zwar umverteilt wird, aber nicht messbar aus oder in das Blatt fließt (die Ergebnisse zu einem einzelnen Hitzestimulus sind nicht dargestellt). Ein echtes Signal muss eine Änderung von mehreren Prozent erzeugen, damit es sich von der Hintergrundstrahlung (ca. 0,4 %) abhebt.



**Abbildung 3.8: Transmissionsmessung an *Glycine max L.*** Abgebildet ist die Transmissionsmessung einer trockengestressten *Glycine max L.* Pflanze mit Terahertzstrahlung (Messort: Philipps-Universität Marburg, Fachbereich: Angewandte Physik AG Koch (Halbleiterphotonik)).

### 3.2.10 Elementaranalyse

Die Messungen an der Elementaranalyse vario EL cube (s. Tab. 3.4) wurden von der technischen Assistentin Frau S. Kruse (mit Unterstützung von Frau C. Riegert) durchgeführt. Diese Methode liefert den prozentualen Elementgehalt bezogen auf die Einwaage des Pflanzenmaterials, durch Verbrennen und damit einhergehender Oxidation als  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{N}_2$  und  $\text{SO}_2$  durch nacheinander angereihte Adsorptionsrohre. Dabei waren nur die Daten des C- und N-Gehaltes von Interesse. In der vorliegenden Arbeit wurde fast ausschließlich Blattmaterial auf den Elementgehalt untersucht.

Die Proben mussten vollkommen  $\text{H}_2\text{O}$ -frei sein, um keine Verfälschung der Ergebnisse bei der Oxidation zu erzeugen. Die vollständige Trocknung wurde durch eine Behandlung von mindestens 48 Stunden im Trockenschrank bei  $105^\circ\text{C}$  erreicht. Mörser und Stößel wurden verwendet, um das getrocknete Blattmaterial zu einem homogenen Pulver zu verarbeiten. Bei kleinen Proben konnten 2 mL Eppendorf Tubes verwendet werden, in denen direkt das Material mit Hilfe eines Plastikstößels pulverisiert wurde. Die Einwaage von 10 mg Probenpulver (real Einwaage betrug 9 – 11 mg) erfolgte in Zinnfolienhüttchen, die durch Falten zur Verdrängung der Luft, welche Stickstoff enthält, verschlossen wurden. Zusätzlich wurde Wolfram(VI)-oxid jeweils in 1- bis 5-facher Menge zu den Proben gegeben,



dieses stimuliert zum einen die Oxidation und unterdrückt zum anderen die Bildung von nicht-flüchtigen Sulfaten. Die Einwaagemenge richtet sich nach dem Elementargehalt in der jeweiligen Probe. Es gilt je geringer der Elementgehalt ist, desto höher muss die eingewogene Materialmenge sein, damit verlässliche Ergebnisse gewonnen werden können. Hinzu kommt, dass die Verbrennungszeit ebenfalls abhängig von dem Elementgehalt des eingewogenen Feststoffes ist.

Als Referenz (Negativkontrolle) diente ein leeres Gefäß und als Standard wurde ein passender gesucht, der in dem prozentualen Bereich der Probe lag (s. Tab. 3.6). Für die Untersuchungen der *Mimosa pudica* Blätter und Wurzeln fand als Standard Atropinsulfat (Firma Elementar) im Konzentrationsbereich 6,8 mg für die Blätter und 7,1 bzw. 7,5 mg für die Wurzeln Verwendung. Für Testläufe der *Mimosa pudica* Proben wurde 2015 der Standard 959 (Elementar) in einer Konzentration von 7,4 mg eingesetzt. Für die *Zea mays* und *Glycine max L.* Pflanzen wiederum konnte als Standard Acetanilid (Firma Elementar) benutzt werden. Zusätzlich wurde der jeweilige Standard wie eine Probe eingewogen, um im Anschluss an die Messung die erhaltenen Werte mit denen des gesetzten Standards vergleichen zu können und eventuelle Abweichungen zu detektieren.

**Tabelle 3.6: Verwendete Standards der Elementaranalyse.**

Name des Standards	N	C	H	S
959 Standard	0,69 %	67,68 %	4,95 %	0,81 %
Atropinsulfat monohydrat	4,03 %	58,77 %	7,25 %	4,61 %
Acetanilid	10,36 %	71,09 %	6,71 %	0,12 %

Die Proben werden von einer automatischen Kontrolleinheit in die Verbrennungskammer eingeführt und dort mit molekularem O<sub>2</sub> bei 1150°C für 120 s verbrannt. Helium wird im Folgenden als Trägergas für die entstandenen Verbrennungsgase über ein auf 850°C erhitztes Kupfernetz geführt, um gegebenenfalls bei der Oxidation entstandene Stickoxide und Schwefeltrioxide zu molekularem N<sub>2</sub> und SO<sub>2</sub> reduzieren zu können. Durch dahinter geschaltete spezifische Adsorptionssäulen wird das Gasgemisch (CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O, und SO<sub>2</sub>) in das jeweilige Gasprodukt aufgetrennt und an den Wärmeleitfähigkeitsdetektor weitergeleitet. Für die Quantifizierung wird im Wärmeleitfähigkeitsdetektor als Referenz die Wärmeleitfähigkeit von reinem Helium mit dem des Gases aus der jeweiligen Adsorptionssäule verglichen. Dabei durchläuft N<sub>2</sub> die vorher genannten Adsorptionssäulen nicht, sondern wird direkt dem Wärmeleitfähigkeitsdetektor zugeführt. Mittels des entstandenen Konzentrationspeaks kann über die Peakfläche und Integration dieser die Massen an Kohlenstoff, Wasserstoff, Stickstoff sowie Schwefel in mg in der Probe ermittelt werden. Durch den Bezug auf die Einwaagemenge werden dann die Elementgehalte in Prozent (%) ermittelt.

### 3.2.11 Druckaufschluss für das ICP-OES

Der Druckaufschluss war als Vorbereitung für die Proben der ICP-OES essentiell.

Für den Druckaufschluss wurde das Blattmaterial im Trockenschrank bei 100°C für mindestens 48 h getrocknet und danach im Exsikkator gelagert. Das trockene Material konnte dann mit Hilfe einer Schere zerkleinert werden. Die zuvor getrockneten und zerkleinerten Proben wurden in Teflongefäße mit 50 mg  $\pm$  2 mg eingewogen. Der Druckaufschluss erfolgte mit 2,5 mL 65%iger Salpetersäure mit einem Mikrowellen Laborsystem (MLS GmbH). Danach wurde die Lösung von den Teflongefäßen in 50 mL Falcon Röhrchen überführt. In diesen war es im Anschluss an den Aufschluss möglich das Probenvolumen auf 15 mL mit destilliertem Wasser aufzufüllen. Das standardisierte Probenvolumen ließ eine nahezu identische Einstellung des pH-Wertes der Proben zu. Dieser ist entscheidend für die Ionisierbarkeit der Elemente und Intensität im Spektrum. Die so aufgeschlossenen Proben wurden dann an Herrn T. Schwarz übergeben, der mit diesen die ICP-OES durchführte.

### 3.2.12 Induktiv gekoppeltes Plasma mit optischer Emissionsspektrometrie (ICP-OES)

Die optische Emissionsspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma ermöglicht eine Anregung der Atome im Plasma und durch die damit verbundene emittierte elektromagnetische Strahlung im Bereich des sichtbaren und ultravioletten Lichtes eine quantitative Analyse der (Spuren-)Elemente. Die jeweilige Elementkonzentration steht in direktem Zusammenhang mit der Intensität der Linien im Spektrum.

Die Messungen an der iCAP Duo 6300 (Thermo Fisher Scientific) (s. Tab. 3.4) wurden von dem technischen Assistenten T. Schwarz durchgeführt.

Über eine automatische Kontrolleinheit werden mittels einer Pumpe die zuvor aufgeschlossenen Proben (Abschnitt 3.2.11) in einem kontinuierlichen Strom aus den Falcon Röhrchen gepumpt. Im Anschluss erfolgt eine Vereinigung von Argongas mit der Probenflüssigkeit im Zerstäuber. Dabei wird die Lösung im Argonstrom mikrofein zerstäubt. Das so entstandene Aerosol kann über eine pneumatische Quarz-Zyklon-Sprühkammer in zwei Kompartimente aufgetrennt werden. Zum einen in große und schwere Teilchen (95 %), die direkt dem Abfluss zugeführt werden und zum anderen in flüssige Teilchen (5 %), die in die Plasmakammer mit Argonplasma gelangen sollen.

Die in der Lösung befindlichen Elemente können durch die hohe Temperatur der Induktionsspule, die von einem Hochfrequenz-Generator gespeist wird und das Argonplasma erzeugt, atomisiert werden (ca. 6000 K) (Skoog und Leary, 1996). Dabei werden die Valenzelektronen der Atome angeregt und erreichen ein höheres Energieniveau. Die Instabilität des angeregten Zustandes sorgt für ein Zurückfallen der angeregten Elektronen auf ein niedrigeres Energieniveau, welches wiederum mit der Aussendung von elektromagnetischer Strahlung im Bereich des UV und sichtbaren Lichtes verbunden ist. So wird ein element-

spezifisches Emissionsspektrum gebildet. Das Echelle-Gitter liefert eine Serie von Linien, die verstärkend interferieren und eine eindeutige Zuordnung des Elements zum Peak durch den kollisionsinduzierten Dissoziations-(CID-)Detektor ermöglicht. Letzterer erlaubt eine radiale und axiale Plasmabetrachtung. Durch den Bezug auf die Einwaagemenge werden dann die Elementgehalte (Al, B, Ba, Ca, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P, S, Zn) in *parts per million* (ppm) ermittelt.

### 3.2.13 Biostatistische Methoden

#### 3.2.13.1 Durchschnittliche Gefäßgröße und Gefäßanzahl

Die Gefäßgröße wurde ermittelt, indem auf den zusammengesetzten Bildern der Querschnitte mit dem Programm ZenPro (Tab. 3.5) jeweils ein Rechteck in jeder Himmelsrichtung zwischen Mark und Rinde gesetzt wurde. Eine Markierung des Umfangs erfolgte für alle innenliegenden Gefäße sowie die jeweiligen Gefäße, die die rechte und obere Seite geschnitten hatten (Abb. 3.3).

Die durchschnittliche Gefäßgröße in  $\text{mm}^2$  konnte mit Hilfe des Mittelwertes der Gefäßgrößen ermittelt werden. Die Berechnung der Gefäßanzahl pro (Gesamt-)Fläche  $\text{mm}^2$  wurde mittels der Umrechnung von  $\mu\text{m}^2$  in  $\text{mm}^2$  vorgenommen.

#### 3.2.13.2 Prozentualer Wassergehalt

Der Wassergehalt wurde durch das Wiegen der vitalen, gut gewässerten Pflanzen und des nach Trocknung bestimmten absoluten Trockengewichtes (Kapitel 3.2.3.1) ermittelt. Da der Wasserverlust über einen Zeitraum betrachtet werden sollte, wurden im Nachhinein der Wassergehalt des jeweiligen Trockenstadiums errechnet. Die Berechnung als prozentualer Wassergehalt erfolgte unter der Annahme, dass eine gute Bewässerung 100 % Wasser im Gewebe entspricht und ein vollkommen trockenes Gewebe dementsprechend 0 % Wasser.

### 3.2.14 Mathematische Berechnungen

Die im Folgenden aufgeführten Erklärungen zu den Berechnungen wurden der Masterarbeit Vuralhan von 2015 (Vuralhan, 2015) entnommen und auf den neusten Stand von Microsoft Office 2016 (Tab. 3.5) angepasst.

#### 3.2.14.1 Arithmetrischer Mittelwert

Der arithmetische Mittelwert (MW) errechnet sich aus dem Quotienten der Summe aller Stichprobenwerten und der Stichprobenmenge.

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$$

### 3.2.14.2 Standardabweichung

Die Funktion STABW.N (Microsoft Excel 2016) (Tab. 3.5) berechnet die Standardabweichung ausgehend von der Grundgesamtheit. Die Standardabweichung ist ein Maß für die Streuung von Werten bezüglich ihres Mittelwerts.

$$\text{STABW.N} = \sigma_x = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n}}$$

### 3.2.14.3 Standardfehler

Der Standardfehler bezeichnet die durchschnittliche Streuung der Stichprobenverteilung. Damit gibt er Auskunft über die Inkonstanz des Mittelwerts.

$$S = \frac{\sigma_x}{\sqrt{n}}$$

### 3.2.14.4 Normalverteilung

Die Normalverteilung der Grundgesamtheit der ermittelten Datenreihen wurde mittels des Shapiro-Wilk-Test überprüft (Shapiro und Wilk, 1965). Diese ist Voraussetzung für die im Folgenden angewandten parametrischen Statistikverfahren (Kapitel 3.2.14.5 und Kapitel 3.2.14.6).

### 3.2.14.5 ungepaarter Students t-Test

Der ungepaarte t-Test (Funktion T.Test (Microsoft Excel 2016)) prüft, ob die Mittelwerte zweier Stichproben (Zweistichproben-Test) bei einer zweiseitigen Verteilung sich signifikant voneinander unterscheiden. Der Test berücksichtigt dabei die ungleiche Varianz (heteroskedatisch) der Stichproben. Die Signifikanzgrenzen wurden wie folgend definiert: \*\*\* :  $p < 0,01$ ; \*\* :  $p < 0,05$ ; \* :  $p < 0,1$ .

$$\text{t-Wert} = \frac{x_1 - x_2}{\sqrt{\frac{\sigma_1^2}{n_1} + \frac{\sigma_2^2}{n_2}}}$$

### 3.2.14.6 Konfidenzniveau

Konfidenzniveaus beschreiben die Fehlergrenze des arithmetischen Mittels der Stichproben bei unendlicher Wiederholung des Versuches. Hier wird das Konfidenzniveau von 95 % verwendet, das aussagt, dass mit einer Wahrscheinlichkeit von 95 % bei unendlicher

Wiederholung des Versuches der Mittelwert in dem Bereich des Konfidenzniveaus liegt. Überlagern sich zwei solcher Niveaus unterschiedlicher Proben, dann ist ein Unterschied nicht signifikant bzw. bei keiner Überschneidung ergibt sich ein signifikanter Unterschied im Mittelwert.

$$\text{Konfidensniveau von 95 \%} = \text{MW} \pm \text{S} * 1,96$$



# KAPITEL 4

---

## Ergebnisse

---

### 4.1 Reaktionen verschiedener Pflanzenarten auf Rotation

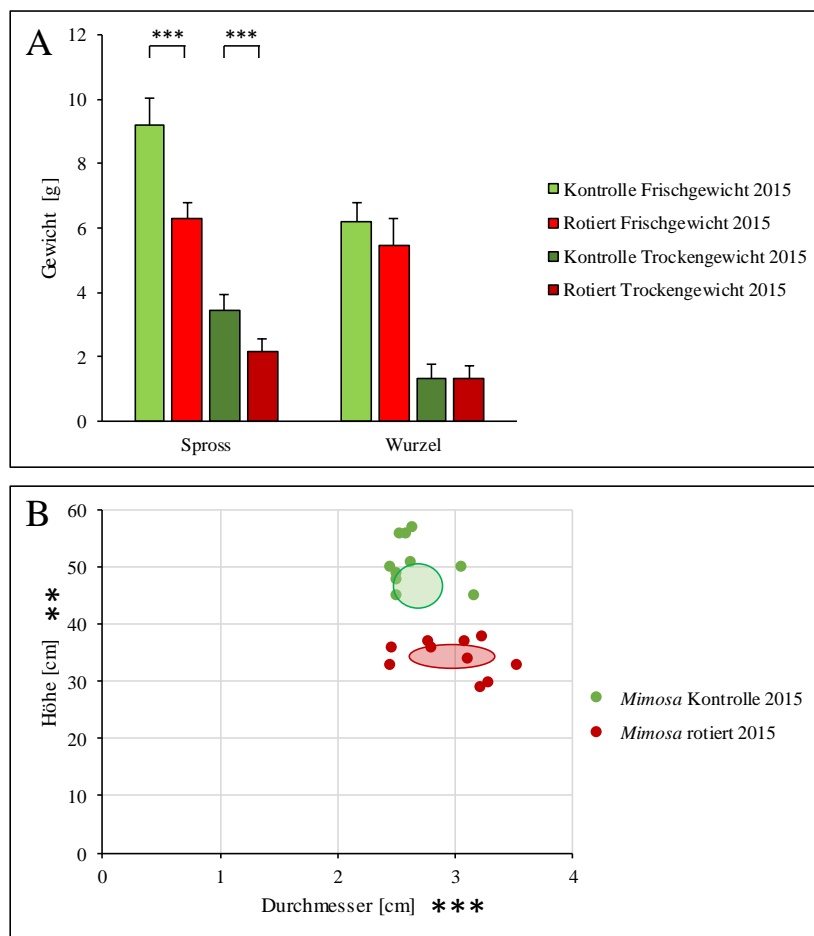
Die verschiedenen Pflanzenarten wurden wie in Kapitel 3.2.2 behandelt. Im Folgenden sind die Ergebnisse der Wuchsveränderungen und der anatomischen Zusammensetzung der rotierten und nicht beeinflussten Individuen dargestellt. Bei der Angabe von Prozenten wurde immer die Kontrolle als 100 % gesetzt und die rotierten Pflanzen im Verhältnis dazu berechnet. Alle anderen Werte sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler.

#### 4.1.1 Anatomische Analysen von rotierten *Mimosa pudica*

Im Rahmen der AG Fromm wurden 2015 Vorversuche durchgeführt. Als Grundlage der Beobachtungen dienten die Analysen von Bünning (1953), die zeigen, dass eine mehrmalige tägliche Reizung bei *Mimosa pudica* eine Veränderung im Habitus induziert und optisch zu einem gedrungenen Wuchs durch Hemmung des Internodienwachstums führt (Bünning, 1953).

In den Vorversuchen, die unabhängig dieser Dissertationsschrift durchgeführt wurden, konnte dieses Ergebnis reproduziert werden. Hinzu kam, dass eine Reizadaption erfolgte, d.h. dass die Fiederblättchen nach einigen Tagen nicht mehr auf den Reiz der Rotation durch Seismonastie reagierten.

Die Ergebnisse des Vorversuches sind im Detail im Folgenden dargestellt:



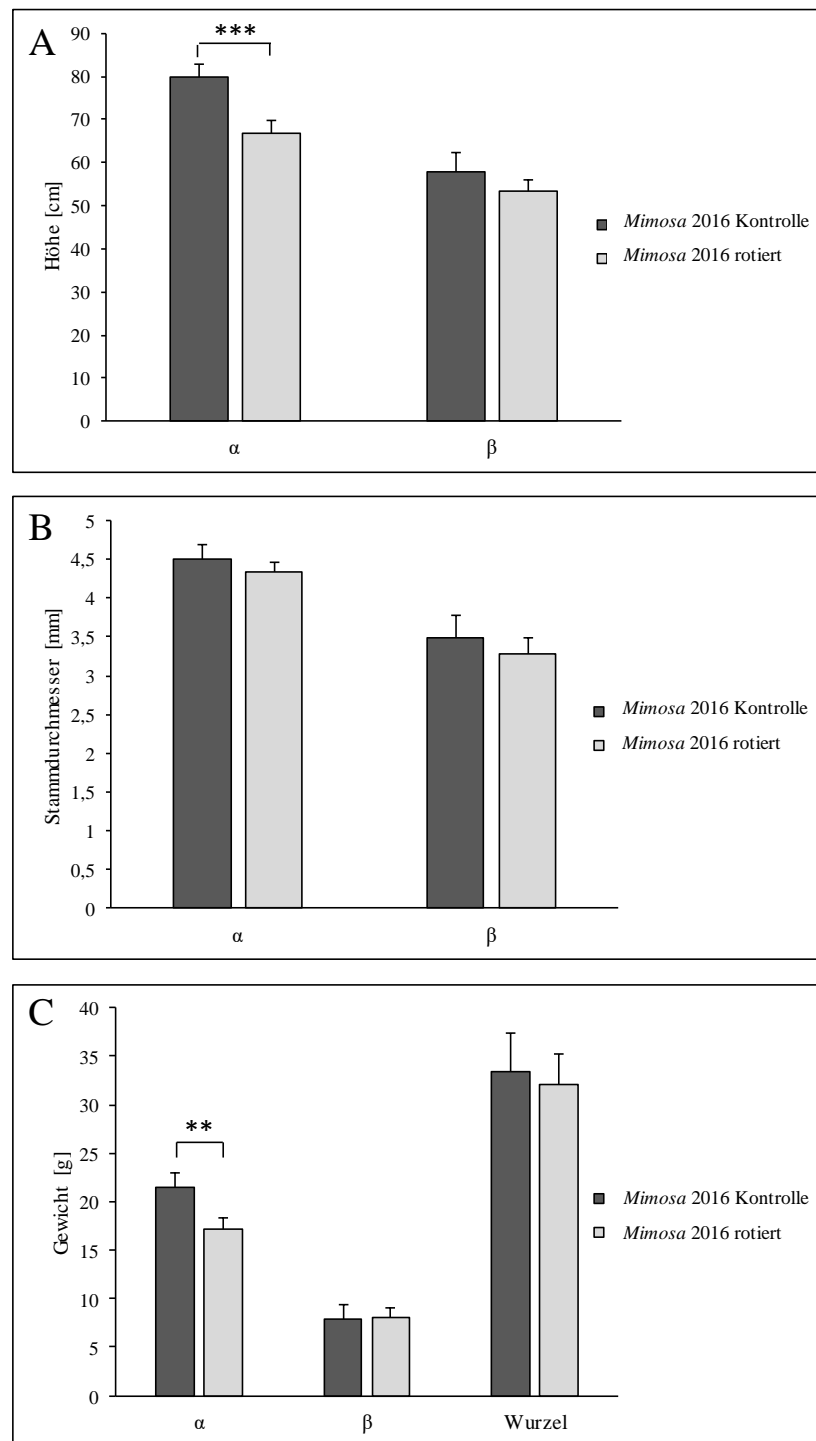
**Abbildung 4.1: Ernteparameter der *Mimosa pudica* 2015.** (A) Das Gewicht der Kontrollpflanzen und rotierten Individuen von Spross und Wurzel. Die Datenpunkte repräsentieren die Mittelwerte  $n=10 \pm$  Standardfehler. (B) Die Höhe im Verhältnis zum Stammdurchmesser der Pflanzen. Die Datenpunkte repräsentieren die einzelnen Individuen der Kontroll- und rotierten Pflanzen. Als Ellipse ist der jeweilige Mittelwert  $\pm$  Konfidenzniveau (95 %) eingezeichnet. Die dargestellte Signifikanz des ungepaarten Students t-Test: \*\*\* :  $p < 0,01$ ; \*\* :  $p < 0,05$ . Unveröffentlichte Ergebnisse von Prof. Dr. Jörg Fromm.

Beim Vorversuch ergab sich, dass die Kontrollpflanzen ( $47,21 \text{ cm} \pm 1,75 \text{ cm}$ ) signifikant höher als die rotierten Individuen ( $34,36 \text{ cm} \pm 1,02 \text{ cm}$ ;  $-27,22 \%$ ) waren (s. Abb. 4.1 B). Die kleineren rotierten Individuen wiesen dafür einen signifikant stärkeren Stammdurchmesser ( $2,98 \text{ mm} \pm 0,11 \text{ mm}$ ;  $+12,45 \%$ ) gegenüber der Kontrolle ( $2,65 \text{ mm} \pm 0,07 \text{ mm}$ ) auf (Abb. 4.1 B). Die Signifikanz in den Unterschieden des Stammdurchmessers konnte bei Betrachtung der Konfidenzniveaus (95 %), in dem sich der Mittelwert der Proben bei unendlichfacher Wiederholung befinden muss, nicht bestätigt werden. Der stärkere Wuchs



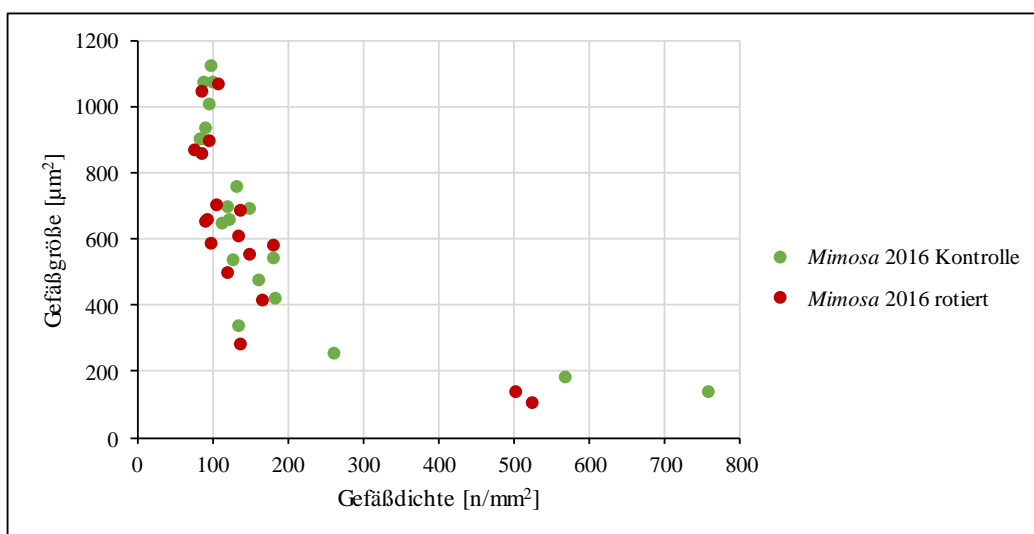
der Kontrollgruppe spiegelte sich ebenso durch ein signifikant höheres Frischgewicht (FG) wider (Kontrolle FG:  $9,21 \text{ g} \pm 0,79 \text{ g}$ ; rotiert FG:  $6,31 \text{ g} \pm 0,45 \text{ g}$  (-31,49 %)). Analog dazu verhielt sich das Trockengewicht (TG) der Kontrolle ( $3,44 \text{ g} \pm 0,50 \text{ g}$ ) gegenüber den rotierten Individuen ( $2,19 \text{ g} \pm 0,34 \text{ g}$  (-36,34 %)). In den Wurzelmassen hingegen konnten keine signifikanten Unterschiede gefunden werden (siehe Abb. 4.1 A).

Bei den im Rahmen dieser Dissertationsschrift durchgeführten Versuchen (2016) befanden sich immer zwei *Mimosa pudica* Pflanzen in einem Topf. Diese wurden in 2 Gruppen unterteilt, sodass die größeren Individuen nachfolgend jeweils als Alpha ( $\alpha$ ) und die kleineren als Beta ( $\beta$ ) bezeichnet werden. Ebenfalls ergab sich bei diesem Versuch ein signifikanter Unterschied in der Höhe der Gruppe  $\alpha$  der Kontrolle gegenüber der rotierten *Mimosa* (-16,21 %) (Abb. 4.2 A). Zusätzlich wurde signifikant mehr Biomasse gebildet ( $\alpha$  Frischgewicht (FG) Kontrolle:  $21,43 \text{ g} \pm 1,58 \text{ g}$ ;  $\alpha$  FG rotiert:  $17,10 \pm 1,29 \text{ g}$ ). In den Wurzeln hatten sich genauso wie 2015 keine signifikanten Unterschiede gebildet (Abb. 4.2 C). Bei der Gruppe  $\beta$  sind keine Unterschiede zu verzeichnen. Wie bei den Vorversuchen war bei keiner der Gruppen ein signifikanter Unterschied im Stammdurchmesser zu finden ( $\alpha$  Kontrolle:  $4,51 \text{ mm} \pm 0,18 \text{ mm}$ ;  $\alpha$  rotiert:  $4,34 \text{ mm} \pm 0,11 \text{ mm}$ ). Weiterhin konnte die Reizadaption reproduziert werden.



**Abbildung 4.2: Ernteparameter von *Mimosa pudica* 2016.** (A) Die Höhe der Gruppen  $\alpha$  und  $\beta$  der jeweiligen Kontrolle und rotierten *Mimosa*; (B) Der Durchmesser der Gruppen  $\alpha$  und  $\beta$  der jeweiligen Kontrolle und rotierten *Mimosa*; (C) Das Gewicht des Sprosses der Gruppen  $\alpha$  und  $\beta$  sowie das Wurzelgewicht der jeweiligen Kontrolle und rotierten *Mimosa*. Die Datenpunkte repräsentieren die Mittelwerte  $n = 10 \pm$  Standardfehler. Die dargestellte Signifikanz des unpaarigen Students t-Test: \*\*\* :  $p < 0,01$ ; \*\* :  $p < 0,05$ .

Die Auswertung der Stammschnitte unter Betrachtung der Gefäßgrößen und Anzahl der Gefäße (Kapitel 3.2.13.1) der rotierten und nicht stimulierten *Mimosa pudica* Pflanzen zeigte keinen signifikanten Unterschied (Abb. 4.3). Ebenso wies eine Separierung in die Gruppen  $\alpha$  und  $\beta$  keine Divergenz auf. Um die Messergebnisse zu eruieren, wurden bei der Kontrolle  $\alpha$  durchschnittlich 44 Gefäße und bei  $\beta$  34 Gefäße je Quadrat vermessen. Für die rotierten Individuen waren es bei der  $\alpha$  Gruppe 42 Gefäße und bei der  $\beta$  Gruppe 33 Gefäße je Quadrat. Daraus ergab sich eine durchschnittliche Gefäßanzahl pro  $\mu\text{m}^2$  von  $163 \pm 45$  für die Kontrolle und  $145 \pm 38$  für die rotierten Individuen mit einem Durchmesser von  $673 \mu\text{m}^2 \pm 297 \mu\text{m}^2$  bzw.  $629 \mu\text{m}^2 \pm 264 \mu\text{m}^2$ .



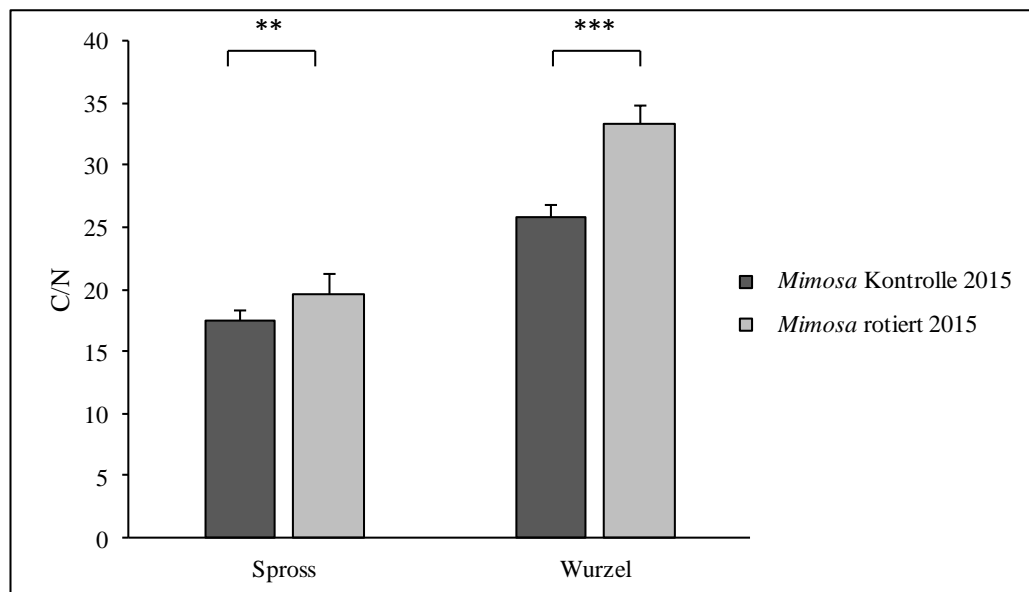
**Abbildung 4.3: Gefäßdichte im Verhältnis zur Gefäßgröße im Stamm von *Mimosa pudica*.** Die Datenpunkte repräsentieren die einzelnen Individuen der Kontroll- und rotierten *Mimosa*.

Insgesamt hat die Stimulation durch Rotation einen veränderten Habitus bei den *Mimosa pudica* Pflanzen induziert, aber keine Veränderungen auf der Gefäßebene im Stamm bewirkt.

#### 4.1.1.1 C/N Analyse des Pflanzenmaterials der rotierten *Mimosa pudica*

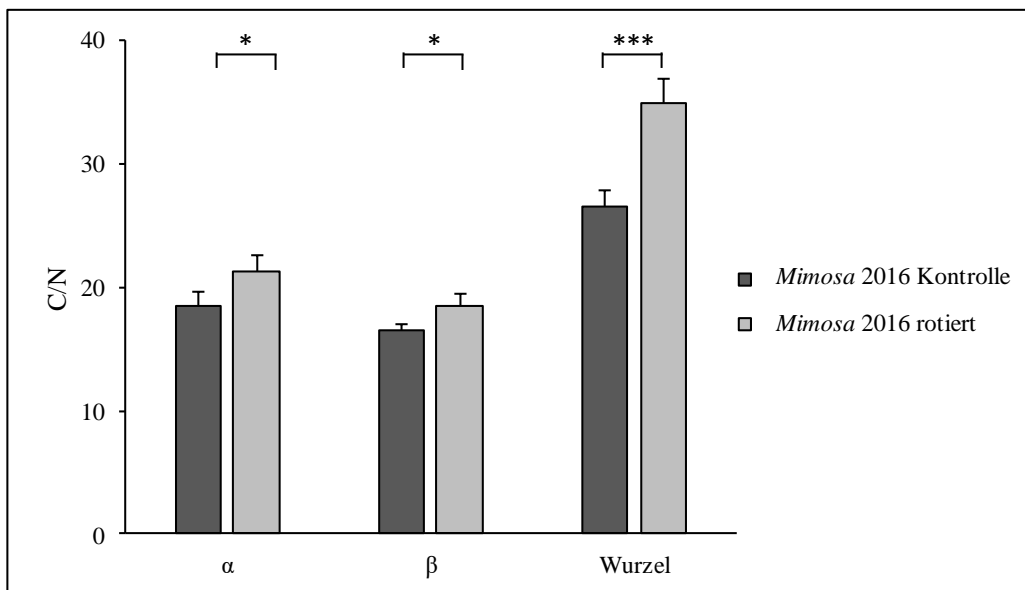
Aus der Elementaranalyse können Erkenntnisse über den Kohlenstoff- und Stickstoffgehalt des pflanzlichen Gewebes gewonnen werden, die eventuell durch den veränderten Wuchs hervorgerufen wurden oder diesen beeinflusst hatten (Kapitel 3.2.10).

Der C/N Quotient der Pflanzen aus dem Vorversuch 2015 der rotierten *Mimosa*-Pflanzen gegenüber der Kontrollgruppe war sowohl im Spross- als auch im Wurzelgewebe signifikant bzw. hoch signifikant größer (Abb. 4.4). Es ergaben sich Unterschiede von +11,85 % im Spross und +28,64 % im Wurzelgewebe. Dabei war jeweils der Stickstoffgehalt im rotierten Gewebe (-0,23 % im Spross; -0,42 % in der Wurzel) im Verhältnis zur Kontrolle geringer, sodass der C/N Quotient höher war.



**Abbildung 4.4: C/N Quotient von *Mimosa pudica* 2015.** Die Datenpunkte repräsentieren die Mittelwerte  $n = 10 \pm$  Standardfehler. Die dargestellte Signifikanz des ungepaarten Students t-Test: \*\*\* :  $p < 0,01$ ; \*\* :  $p < 0,05$ . Unveröffentlichte Ergebnisse von Prof. Dr. Jörg Fromm.

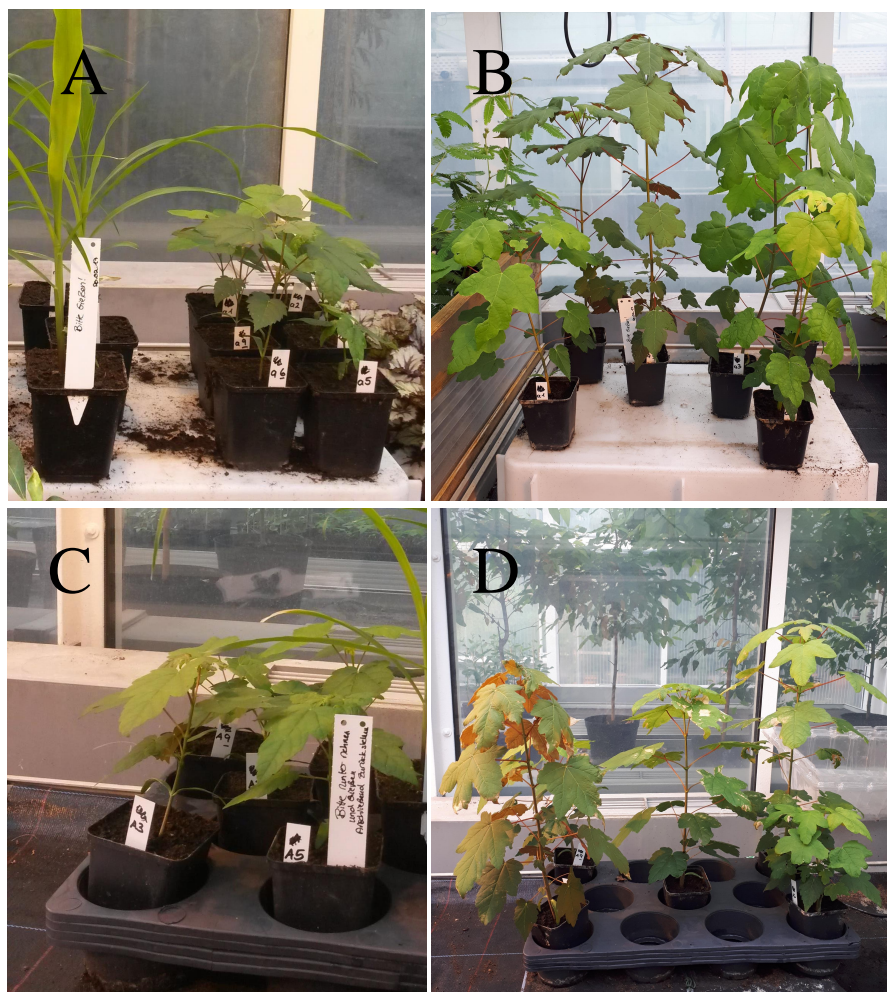
Bei der Wiederholung des Versuches gab es in beiden Gruppen leicht signifikante Unterschiede der rotierten *Mimosa*-Pflanzen ( $\alpha$ : +14,98 %;  $\beta$ : +11,81 %) gegenüber der Kontrolle (Abb. 4.5). Zusätzlich konnten bei der Analyse des Wurzelmaterials die Ergebnisse von 2015 reproduziert werden, sodass sich hoch signifikante Unterschiede des C/N Quotienten der rotierten Pflanzen (+31,66 %) im Vergleich zur Kontrolle ergaben. Ebenfalls resultierte die Erhöhung des C/N Anteils im rotierten Gewebe analog zum Vorversuch aus einem verminderten Stickstoffgehalt ( $\alpha$  Spross bzw. Wurzel: -0,37 %;  $\beta$ : 0,29 %). Im Gegensatz zu den vorherigen Ergebnissen gab es leichte Abweichungen des Kohlenstoffgehaltes im  $\alpha$  Sprossgewebe rotiert (-4,61 %) im Vergleich zur Kontrolle.



**Abbildung 4.5: C/N Quotient von *Mimosa pudica* 2016.** Die Datenpunkte repräsentieren die Mittelwerte  $n = 10 \pm$  Standardfehler. Die dargestellte Signifikanz des ungepaarten Students t-Test: \*\*\* :  $p < 0,01$ ; \* :  $p < 0,1$ .

#### 4.1.2 Anatomische Analyse von rotiertem *Acer pseudoplatanus*

Die gewonnenen Erkenntnisse des Rotationsversuches von *Mimosa pudica* wurden auf eine weitere verholzende Pflanzenarten übertragen. Dafür wurde *Acer pseudoplatanus* gewählt (Abb. 4.6 A und C).



**Abbildung 4.6:** *Acer pseudoplatanus* im Rotationsversuch. (A) *Acer* Kontrollbäume (rechts) nach 6 Tagen seit Versuchsbeginn; (B) rotierte *Acer* nach 6 Tagen seit Versuchsbeginn; (C) *Acer* Kontrollbäume nach 8 Wochen; (D) rotierte *Acer* Kontrollbäume nach 8 Wochen.

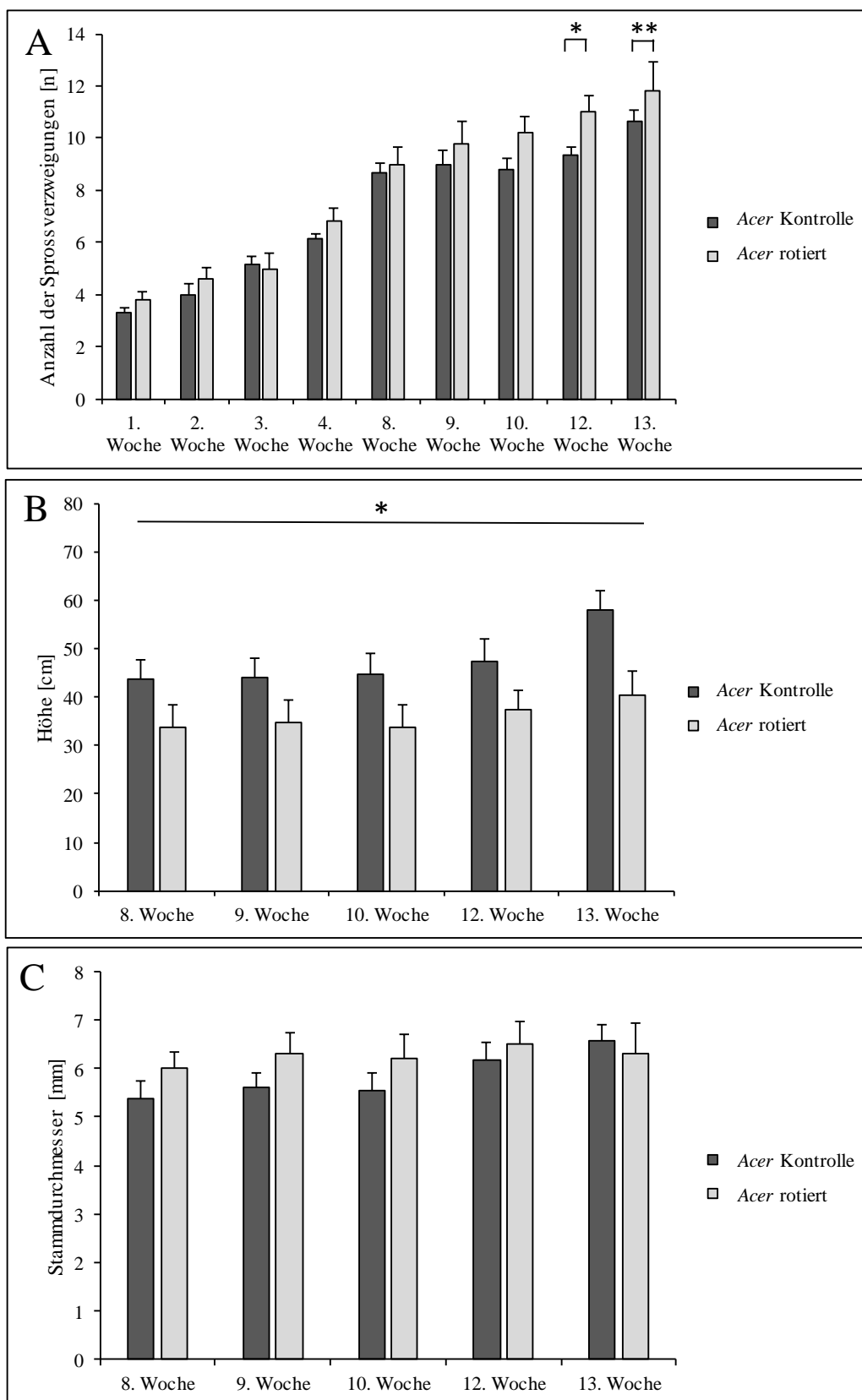
Beim Rotationsversuch der aus Samen angezogenen *Acer pseudoplatanus*-Pflanzen ergaben sich zum Ende des Versuches ab der 12. Woche signifikant mehr Sprossverzweigungen bei den rotierten Individuen (jeweils nach 13 Wochen; Verzweigungen Kontrolle:  $10,67 \pm 0,38$ ; Verzweigungen rotiert:  $11,80 \pm 1,11$ ) und dadurch zwangsläufig eine größere Blattanzahl (Abb. 4.7 A).

Ebenso gab es Unterschiede in der Blattgröße. So war der Durchmesser des größten *Acer* Blattes jedes rotierten Baumes ( $8,50 \text{ cm} \pm 0,56 \text{ cm}$ ) im Vergleich zu den Kontrollbäumen ( $11,33 \text{ cm} \pm 0,56 \text{ cm}$ ) hoch signifikant kleiner und betrug nur 75 % im Vergleich zur Kontrolle (siehe Abb. 4.8).

Ab einer Versuchsdauer von 8 Wochen waren die unbehandelten Individuen leicht signifi-

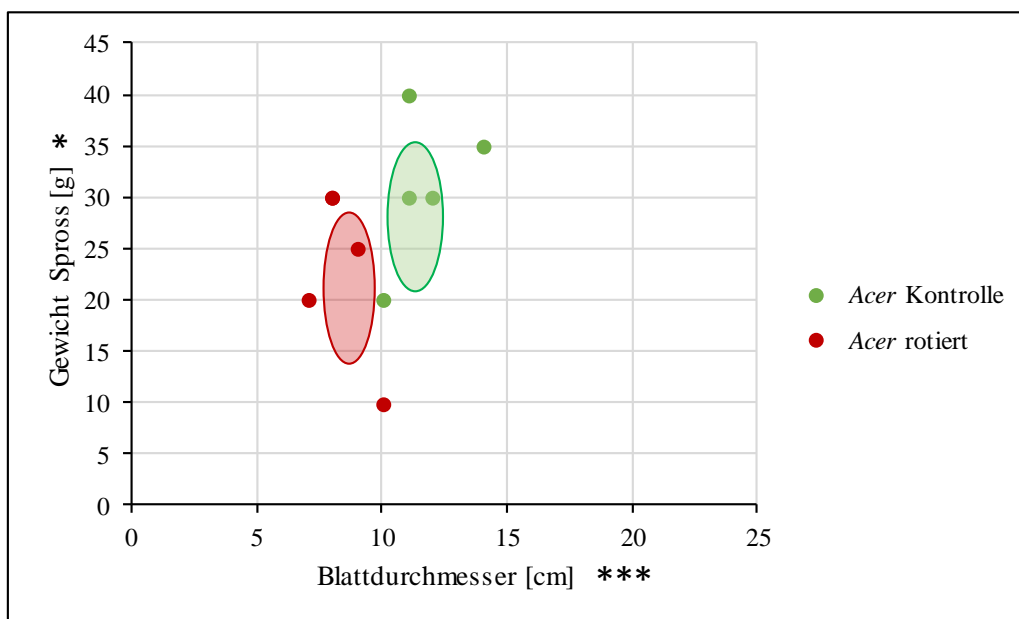
kant größer gegenüber den rotierten (Abb. 4.6 B und D). Die rotierten Pflanzen wiesen im Verhältnis zur Kontrolle nur eine durchschnittliche Höhe von 77,63 % im Zeitraum der Wochen 8 bis 12 auf. Innerhalb der letzten Versuchswoche erfuhren die Kontrollpflanzen einen Wachstumsschub, sodass die rotierten Individuen nach 13 Wochen nur noch eine Höhe von 69,40 % im Verhältnis zur Kontrolle besaßen (Abb. 4.7 B).

Dies spiegelte sich ebenso in dem leicht signifikanten Unterschied in der Biomasse (FG des Sprosses, Kontrolle:  $28,33 \text{ g} \pm 3,47 \text{ g}$ ; rotiert:  $21,25 \text{ g} \pm 3,70 \text{ g}$ ) wider (Abb. 4.8). Dabei ergab sich allerdings ein annähernd gleicher Stammdurchmesser (Kontrolle:  $5,86 \text{ mm} \pm 0,35 \text{ mm}$ ; rotiert:  $6,27 \text{ mm} \pm 0,46 \text{ mm}$ ) (Abb. 4.7C). Zu Anfang war ein Unterschied sichtbar, der jedoch weder signifikant war noch im zeitlichen Verlauf Bestand hatte. Der starke Zuwachs in der Höhe der Kontrollpflanzen war auch in einer Zunahme des Stammdurchmessers zu detektieren.



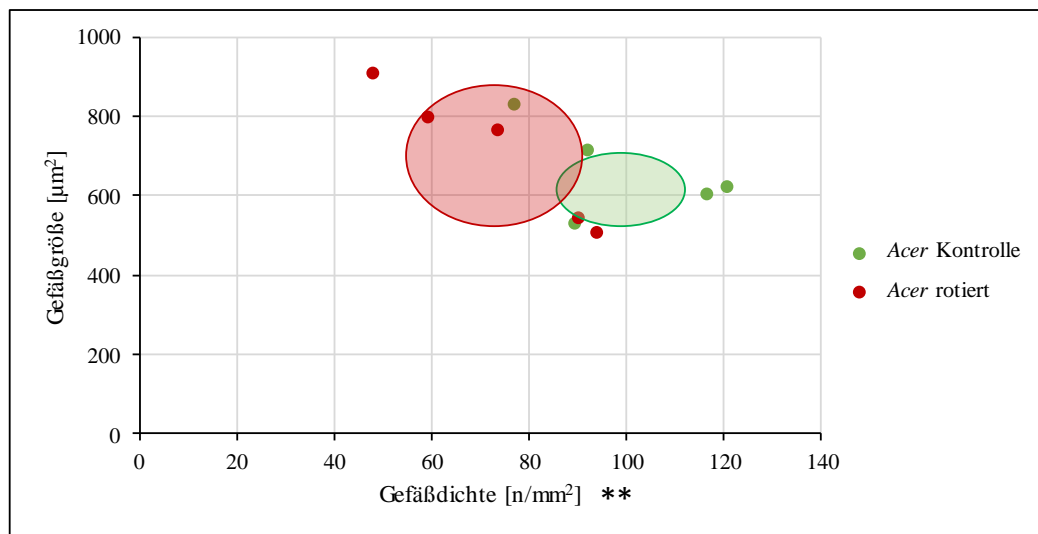
**Abbildung 4.7: Rotationsinduzierte Parameter von *Acer pseudoplatanus* im Vergleich zu den Kontrollbäumen.** (A) Anzahl der Blattverzweigungen; (B) Höhe ab 8 Wochen im Versuch; (C) Stammdurchmesser ab 8 Wochen im Versuch. Die Datenpunkte repräsentieren die Mittelwerte  $n = 6 \pm$  Standardfehler. Die dargestellte Signifikanz des ungepaarten Students t-Test: \*\* :  $p < 0,05$ ; \* :  $p < 0,1$ .





**Abbildung 4.8: Ernteparameter von *Acer pseudoplatanus*.** Darstellung des Blattdurchmessers im Verhältnis zum Gewicht des Sprosses. Die Datenpunkte repräsentieren die einzelnen Individuen der Kontroll- und rotierten Bäume. Als Ellipse ist der jeweilige Mittelwert  $\pm$  Konfidenzniveau (95 %) eingezeichnet. Die dargestellte Signifikanz des ungepaarten Students t-Test: \*\*\* :  $p < 0,1$ ; \* :  $p < 0,1$ .

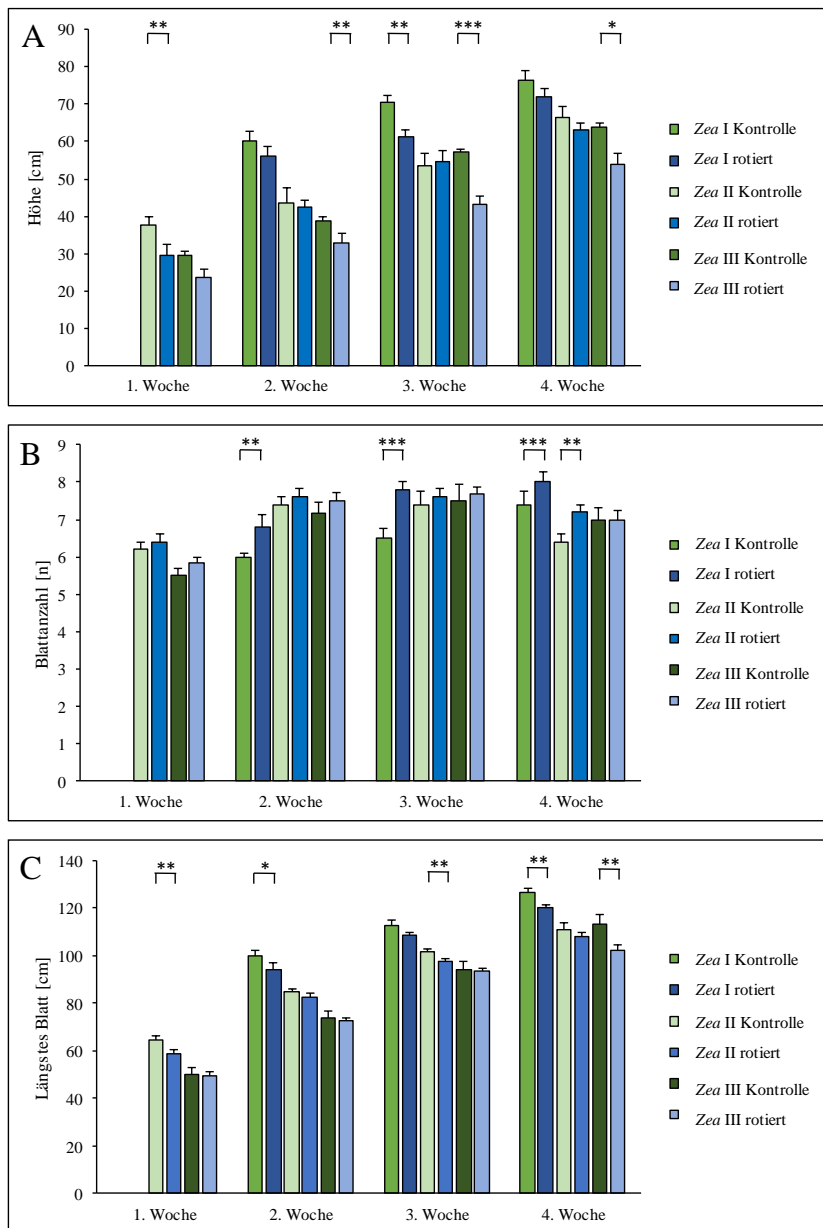
Obwohl sich bei *Mimosa* keine Unterschiede in der anatomischen Struktur bezüglich Gefäßgröße und Anzahl der Gefäße durch die Rotation ergeben hatten, konnte bei *Acer* eine signifikant geringere Gefäßdichte bei den rotierten Individuen mit  $68,53 \pm 8,62$  pro  $\text{mm}^2$  im Vergleich zu den Kontrollbäumen mit  $98,99 \pm 7,46$  pro  $\text{mm}^2$  ermittelt werden (Abb. 4.9). Die Signifikanz der unterschiedlichen Gefäßdichten wurde über das Konfidenzniveau (95 %) nicht bestätigt. Vermutlich bedingt durch einen geringen Probenumfang und daraus resultierenden größeren Standardfehler. Bei der Gefäßgröße ergab sich hingegen kein signifikanter Unterschied. Insgesamt wurden bei den Kontrollpflanzen je Rechteck im Durchschnitt 56 Gefäße und bei den rotierten Individuen je 47 Gefäße vermessen.



**Abbildung 4.9: Gefäßdichte im Verhältnis zur Gefäßgröße im Stamm von *Acer pseudoplatanus* Bäumen.** Die Datenpunkte repräsentieren die einzelnen Individuen der Kontroll- und rotierten Bäume. Als Ellipse ist der jeweilige Mittelwert  $\pm$  Konfidenzniveau (95 %) eingezeichnet. Die dargestellte Signifikanz des ungepaarten Students t-Test: \*\* :  $p < 0,05$ .

#### 4.1.3 Anatomische Analyse von rotiertem *Zea mays*

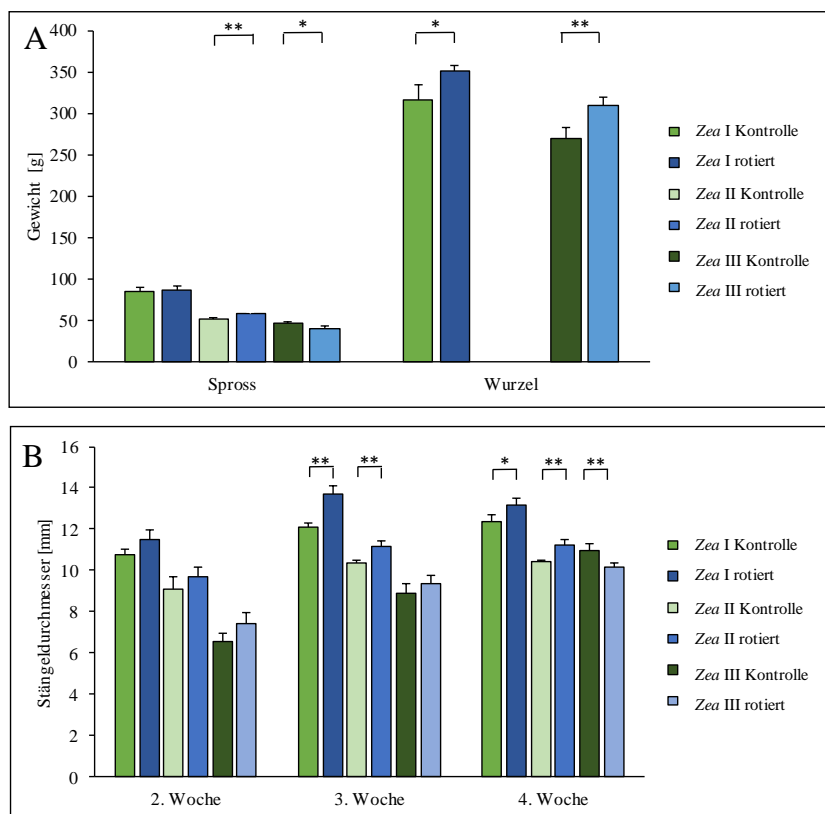
Für die Untersuchung von nicht verholzenden Arten wurde der Rotationsversuch mit *Zea mays* Pflanzen in drei Versuchswiederholungen (*Zea* I – III) durchgeführt. Im Folgenden sind die Messwerte aller drei Durchläufe zusammen dargestellt. Bei *Zea* I wurden die Werte das erste Mal nach 2 Wochen erfasst, deshalb fehlen anschließend die Messwerte nach der 1. Versuchswoche.



**Abbildung 4.10: Wachstumsparameter der *Zea mays* Pflanzen.** (A) Höhe von *Zea* I – III; (B) Blattanzahl von *Zea* I – III; (C) Das jeweils längste Blatt von *Zea* I – III. Die Datenpunkte repräsentieren die Mittelwerte  $n= 5 \pm$  Standardfehler. Jeweils nebeneinander sind die Kontroll- und rotierten Individuen abgebildet. Die dargestellte Signifikanz des ungepaarten Students t-Test: \*\*\* :  $p < 0,01$ ; \*\* :  $p < 0,05$ ; \* :  $p < 0,1$ .

Eine signifikante Wuchshemmung der rotierten Pflanzen zu den Kontrollgruppen war nach 3 Wochen Versuchszeitraum bei *Zea* I (-13,19 %) und *Zea* III (2. Woche: -15,48 %; 3.

Woche: -24,37 %) messbar. Am Ende des Versuchszeitraumes (nach 4 Wochen) konnte eine Signifikanz dieses Unterschiedes nur noch bei dem *Zea* III Versuchsdurchlauf in Form von einer Wuchshemmung um 15,66 % gegenüber der Kontrolle festgestellt werden (Abb. 4.10 A).



**Abbildung 4.11: Ernteparameter und Stängeldurchmesser der *Zea mays* Pflanzen.**

(A) Gewicht des Sprosses und der Wurzel; (B) Stängeldurchmesser im zeitlichen Verlauf. Die Datenpunkte repräsentieren die Mittelwerte  $n = 5 \pm$  Standardfehler. Die dargestellte Signifikanz des ungepaarten Students t-Test: \*\* :  $p < 0,05$ ; \* :  $p < 0,1$ .

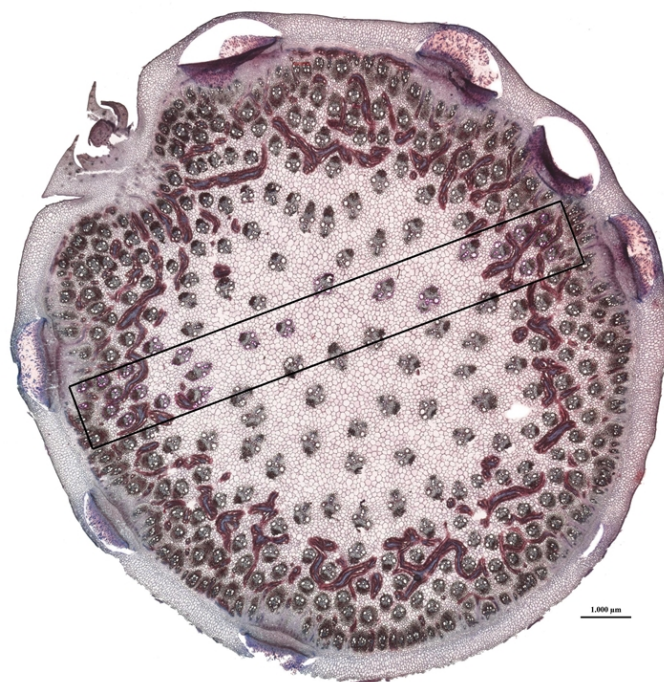
Im Bezug auf die Blattanzahl ist eine eindeutige Tendenz der vermehrten Blattausbildung durch Rotation bei *Zea* I (3. Woche: Kontrolle  $6,5 \pm 0,5$  zu rotiert  $7,8 \pm 0,23$ ; 4. Woche: Kontrolle  $7,4 \pm 0,36$  zu rotiert  $8 \pm 0,28$ ) und *Zea* II (Kontrolle  $6,4 \pm 0,22$  zu rotiert  $7,2 \pm 0,18$ ) nach 4 Wochen zu beobachten gewesen (Abb. 4.10 B).

Dies spiegelt sich jedoch nicht eindeutig in der Bildung der oberirdischen Biomasse wider. Bei *Zea* I traten keine relevanten Unterschiede im Sprossgewicht auf. *Zea* II hingegen hat bei den rotierten Pflanzen signifikant mehr Biomasse (+13,70 %) als bei der Kontrolle gebildet. Bei *Zea* III ist überraschenderweise weniger Biomasse bei den rotierten Pflanzen

(-13,04 %) gegenüber der Kontrolle entstanden (Abb. 4.11 A). Die Analyse der Wurzelbiomassen lieferte bei beiden untersuchten Gruppen signifikante Unterschiede, sodass mehr Wurzelmasse bei den rotierten Pflanzen (I: +11,08 %; III: +14,81%) gegenüber den Kontrollpflanzen gebildet worden waren (Abb. 4.11 A). Bei *Zea* II wurde das Gewicht der Wurzelballen nicht erfasst.

Beim Durchmesser der Stängel ergab sich, dass bei den Durchläufen der Gruppen I (3. Woche: +13,14 %; 4. Woche: +6,30 %) und II (durchschnittlich +7,55 %) die jeweiligen Stängel der rotierten Pflanzen signifikant breiter waren als die der Kontrollgruppen. Diese Zunahme war bereits nach 3 Wochen zu erkennen (Abb. 4.11 B). Beim Durchlauf III war dieser Zuwachs zunächst auch vorhanden, kehrte sich dann aber um, indem die Kontrolle als Begleiterscheinung des Wachstumsschubes zusätzlich einen stärkeren Stängeldurchmesser ausbildete (rotiert: -7,57 %) (Abb. 4.11 B).

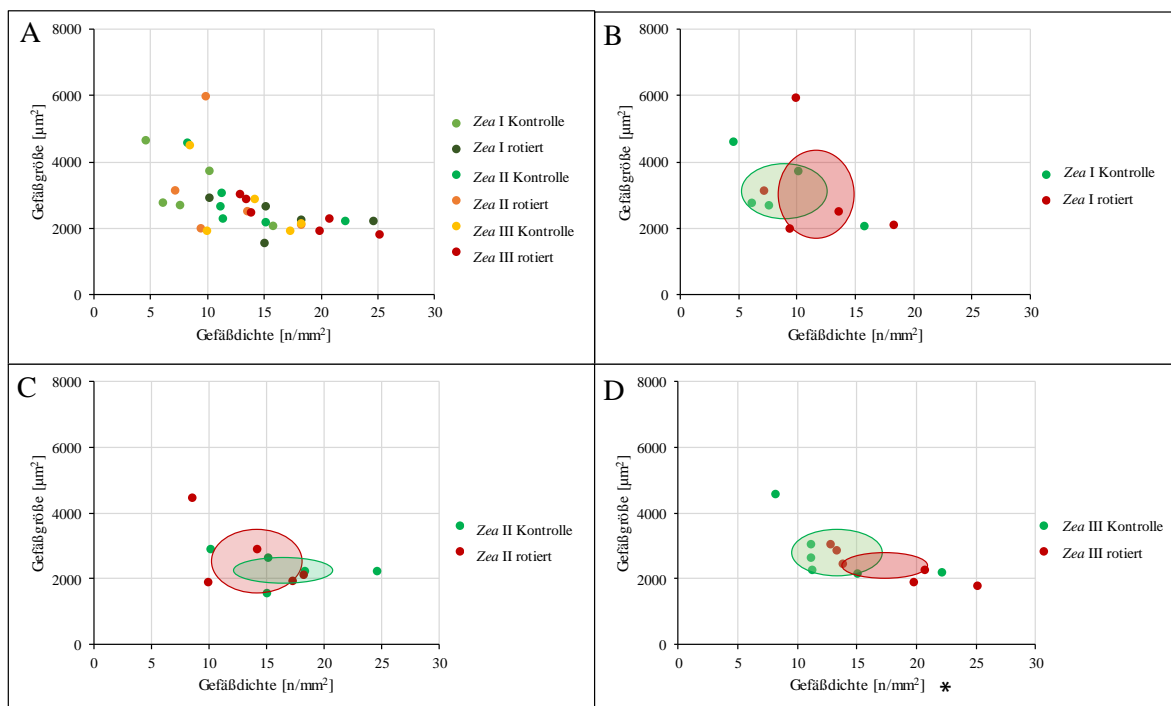
Für die Auswertung auf anatomischer Ebene wurden bei *Zea mays* im Durchschnitt jeweils  $115 \pm 7$  Gefäße je Querschnitt vermessen. Da *Zea mays* eine monokotyledone (einkeimblättrige) Pflanze ist, wurde jeweils nur ein Rechteck vermessen, das über den kompletten Querschnitt ging (Abb. 4.12).



**Abbildung 4.12: Querschnitt des *Zea mays* Sprosses.** Einer rotierten *Zea* I Pflanze, Schnittdicke 6 µm. In schwarz ist das Rechteck zur Gefäßvermessung dargestellt. Mit einer 2,5-fachen Vergrößerung fotografiert.

Bei der Gefäßdichte war kein eindeutiger Effekt zu beobachten, sodass bei *Zea* III leicht

signifikant mehr Gefäße pro  $\text{mm}^2$  (+26,96 %) zu finden waren (Abb. 4.13 D). Allerdings hatten sich bei der Betrachtung der Konfidenzniveaus bei 95 % bei keiner der Gruppen *Zea* I – III weder in der Gefäßgröße noch in der Gefäßdichte signifikante Unterschiede ergeben. Ebenso gab es keine signifikanten Unterschiede in den Gefäßgrößender Gesamtübersicht, die sich hauptsächlich zwischen  $2000 \mu\text{m}^2$  bis  $3000 \mu\text{m}^2$  bewegten (Abb. 4.13 A).



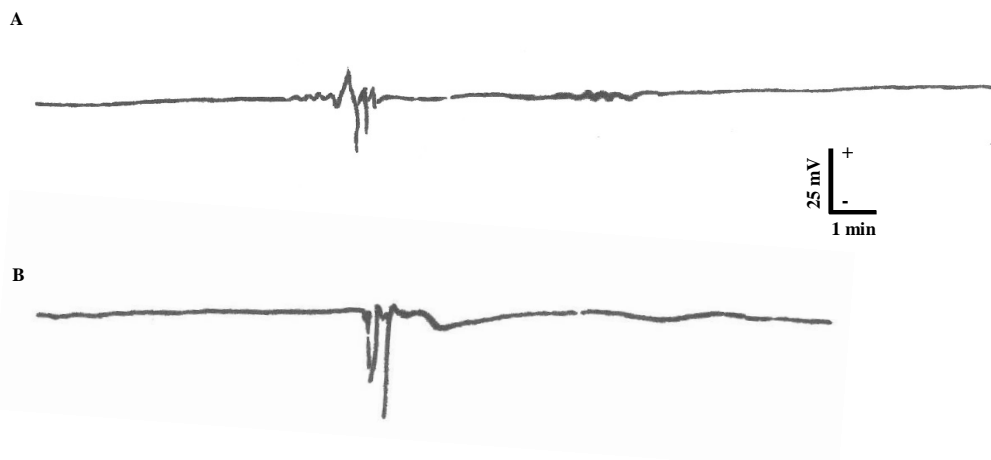
**Abbildung 4.13: Verhältnis Gefäßdichte zur Gefäßgröße von *Zea mays*.** (A) Übersicht *Zea* I – III; (B) *Zea* I; (C) *Zea* II; (D) *Zea* III. Die Datenpunkte repräsentieren die einzelnen Individuen der Kontroll- und rotierten Pflanzen. Als Ellipse ist der jeweilige Mittelwert  $\pm$  Konfidenzniveau (95 %) eingezeichnet.

Insgesamt spiegelten sich beim ersten Versuchsdurchlauf an *Zea mays* (*Zea* I) die zuvor gewonnenen Ergebnisse von *Mimosa pudica* wider. Eine Analogie zur dritten Wiederholung (*Zea* III) ist teilweise auch erkennbar, allerdings lieferte der zweite Durchlauf (*Zea* II) trotz deckungsgleicher Durchführung teils identische, teils widersprüchliche Ergebnisse, deren Ursprung nicht ersichtlich war.

#### 4.1.3.1 Elektrische Signale in rotiertem *Zea mays*

Mittels intrazellulärer Mikroelektroden wurde überprüft, inwiefern die Rotation elektrische Signale in den *Zea mays* Pflanzen hervorruft. In Abbildung 4.14 sind die, durch die Rotation

induzierten, elektrischen Signale an *Zea mays* dargestellt. Es ergaben sich elektrische Potenziale von 25 mV bis zu 40 mV während der Rotation.



**Abbildung 4.14: Messung elektrischer Signale bei der Rotation.** (A) Beispiel einer Signalstärke von 25 mV ( $n = 5$ ) einer intrazellularen Potenzialmessung während der Rotation; (B) Analog zu A mit einer Signalstärke von 40 mV ( $n = 5$ ).

#### 4.1.4 Transmissionsmessungen und Rotation

An *Glycine max L.* wurde die nicht invasive Methode der Transmissionsmessungen in Marburg (Kapitel 3.2.9) durchgeführt, um zu überprüfen inwieweit leichtes Rotieren sich auf die Transmission bzw. Wasserverteilung im Gewebe auswirkt. Dabei konnte keine Beeinflussung der Wasserverteilung im Gewebe festgestellt werden. Obwohl unter gleichen Bedingungen elektrische Signale zu messen waren (siehe Kapitel 4.1.3.1).

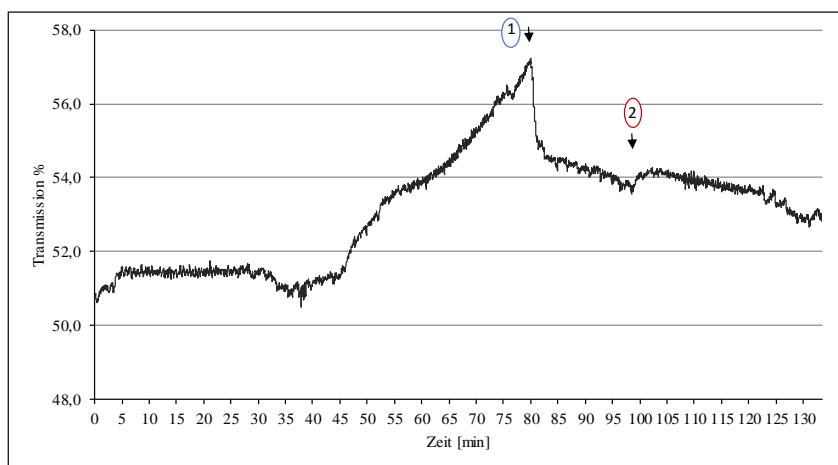
Eine stärkere Rotation war nicht möglich, da zum einen gewährleistet werden musste, dass die gleiche Blattfläche von dem Laser gemessen wird, da dies sonst zur Verfälschung der Messergebnisse führt. Zum anderen musste verhindert werden, dass das Messsystem Schaden nimmt. Daher wurde die Kombination aus Rotation und Transmissionsmessung mittels THz-Laser als Versuchsaufbau verworfen.

## 4.2 Simultane Stimulation durch mehrere Reize

### 4.2.1 THz-Transmissionsmessungen der absoluten Wassermenge in Blättern

Die bereits erwähnten Messungen an der Philipps-Universität Marburg mit Dr. Ralf Gente fanden an trockengestressten *Glycine max L.* Pflanzen, wie in Kapitel 3.2.9 beschrieben, statt.

Dabei wurde die THz-Transmission an einem Blatt gemessen und anschließend wiederbewässert (s. Abb. 4.15 (1)). Sobald die Wasseraufnahme durch Abnahme der Transmission erkennbar war, wurde an demselben Blatt ein Feuerreiz gesetzt (Abb. 4.15 (2)). Die Transmissionsmessung im Terahertz Bereich zeigte einen Einbruch in der Wasseraufnahme mit Wasserabgabe nach dem Hitzestimulus. Dies deutet auf einen Einfluss des Stimulus hin.



**Abbildung 4.15:** Transmissionsmessung an *Glycine max L.* 1: Wiederbewässerung; 2: Feuerreiz an der Messblattspitze.

Mit *Mimosa pudica* sollten die Ergebnisse reproduziert werden. Bei *Mimosa* kommt es zu Wasserverschiebungen in den Gelenken beim Falten. Mit dem verwendeten Messsystem war es nicht möglich ein einzelnes Fiederblatt anzuvisieren. Zusätzlich ergab sich, dass die *Mimosa* Pflanzen falteten, sobald sie unter Trockenstress litten, sodass man keine Zunahme der Transmission hätte messen können. Dadurch wurde eine Messung unmöglich. Es wurde durch das Fixieren der Blätter auf einer Klebefolie getestet, ob dieses Problem zu lösen sei. Allerdings empfanden die Pflanzen dieses ebenfalls als Reiz und bedingt durch den Trockenstress kam es zu keiner Relaxion. Daraufhin wurde erfolgreich versucht, eine Verkleinerung der Messfläche auf ein einzelnes Fiederblatt zu nutzen. Bei der anschließenden Messung konnte keine Veränderung in der Transmission beobachtet werden.



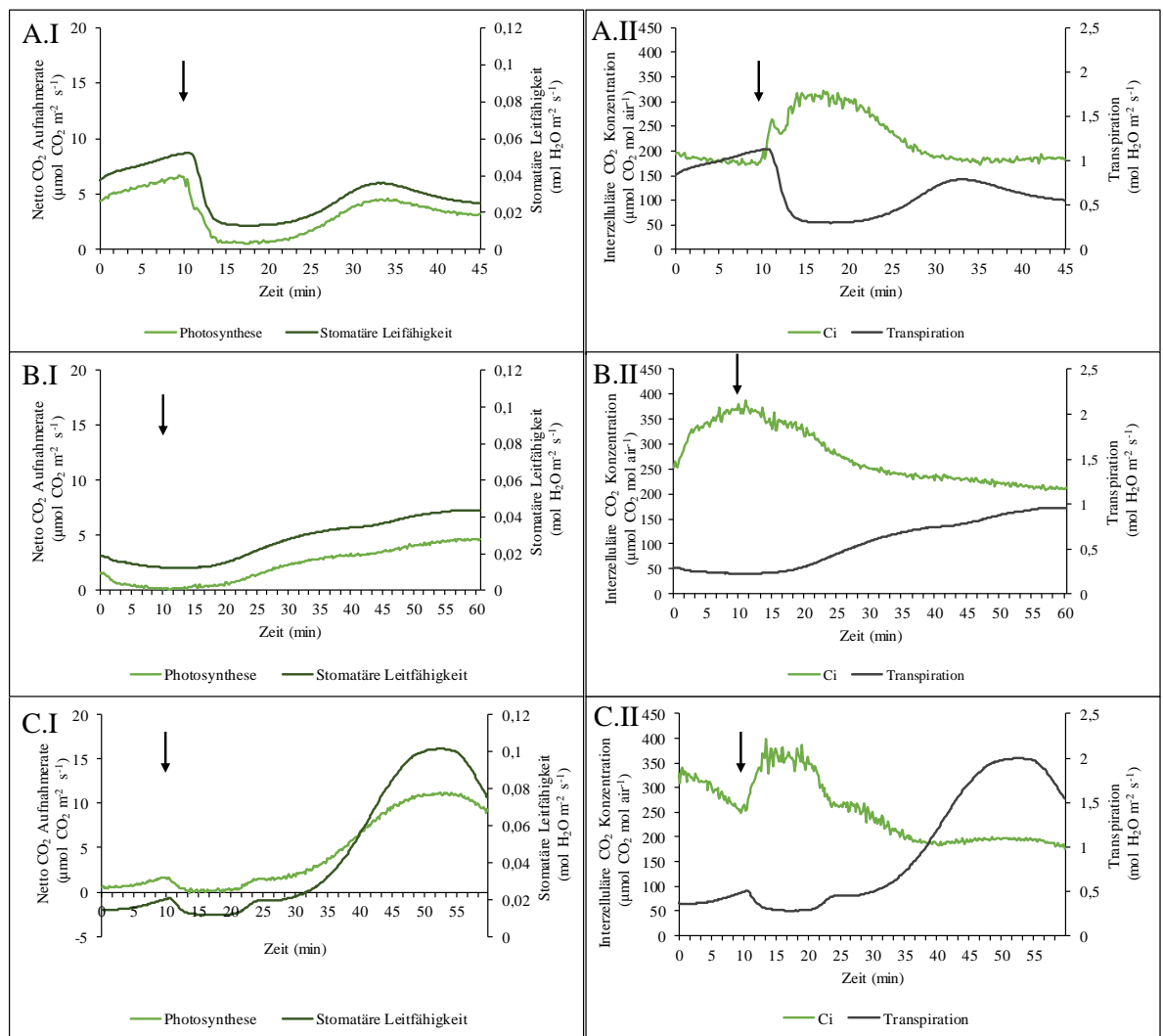
Daher wurde *Mimosa pudica* als Pflanze für die Messung der Transmission unter Trockenstress verworfen.

#### 4.2.2 Der Einfluss von Hitzereiz und Wiederbewässerung auf den Gaswechsel von *Glycine max L.* und *Zea mays*

In Anlehnung an die Messungen in Marburg wurden bei trockengestressten *Glycine max L.* Pflanzen analog zu den später erwähnten *Zea mays* Pflanzen der Gaswechsel und die elektrischen Signale gemessen. Bei den Untersuchungen des Gaswechsels wurde versucht, den Versuchsaufbau aus Marburg zu rekonstruieren, in dem zunächst wiederbewässert wurde und 20 Minuten später der Feuerreiz erfolgte. Allerdings erholten sich die Gaswechselparameter trotz mehrmaliger Wiederholung nicht.

Auf Grundlage der Vorversuche in Marburg wurden dann Experimente mit zwei zeitgleichen Stimuli entworfen und durchgeführt. Zusätzlich wurde parallel der Gaswechsel gemessen. Trockengetresster *Glycine max L.* wurde nach einer Woche ohne Bewässerung bzw. bei *Zea mays* nach drei Wochen, über 3 Sekunden mit einem Hitzestimulus an der Blattspitze erregt und zeitgleich wiederbewässert. *Zea mays* kann aufgrund des C<sub>4</sub>-Metabolismus längere Trockenperioden im Vergleich zu *Glycine max L.* unbeschadet überstehen.

Die Messung des Gaswechsels erfolgte wie in Kapitel 3.2.7 beschrieben mit dem Li-6400 XT. Als Vergleich dienten Pflanzen der jeweiligen Art bei der gleichen Anzucht die jeweils nur einem Reiz ausgesetzt waren, d.h. entweder Hitzereiz oder Wiederbewässerung nach Trockenstress. Als Parameter sind im Folgenden die Netto CO<sub>2</sub> Aufnahme (Photosynthese), stomatäre Leitfähigkeit, interzelluläre CO<sub>2</sub> Konzentration und die Transpiration während des Versuches dargestellt.

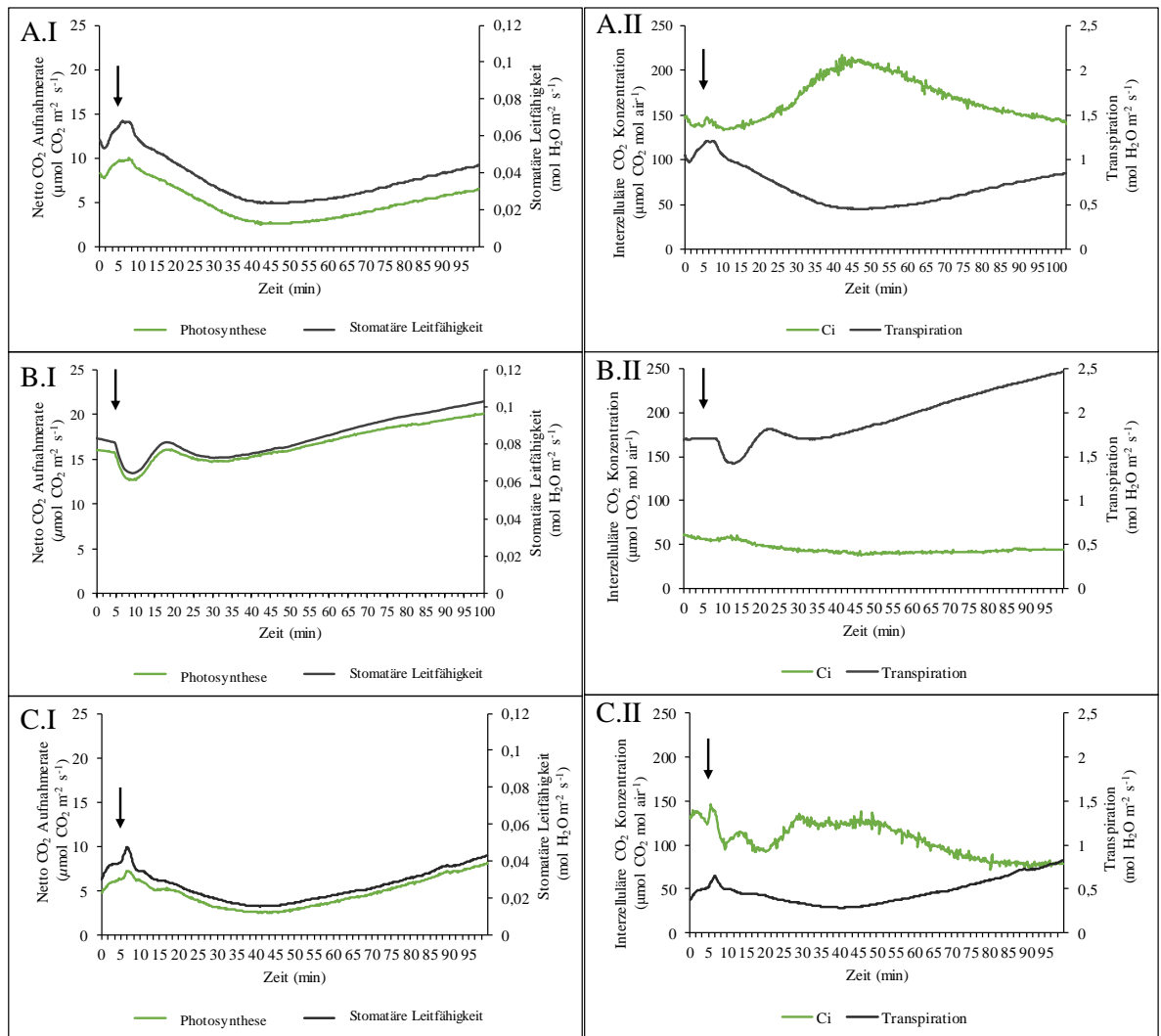


**Abbildung 4.16: Änderungen des Gaswechsel bei *Glycine max* L. nach Stimulation der Blattspitze und/oder Wiederbewässerung.** (I) Photosynthese und stomatäre Leitfähigkeit; (II) Interzelluläre CO<sub>2</sub> Konzentration ( $C_i$ ) und Transpiration; (A) Hitzestimulus: Die Blattspitze wurde 3 s lang durch Hitze stimuliert; (B) Wiederbewässerung: Das Boden-/Wurzelsystem wurde erneut mit 2,5 L H<sub>2</sub>O bewässert; (C) Zeitgleiche Wiederbewässerung und Hitzestimulation wie bei A und B. Dargestellt sind typische Gaswechselverläufe aus einer Reihe von Messungen ( $n = 5$ ).

Nach dem Hitzestimulus an *Glycine max* L. kam es unmittelbar zu einem Einbruch der Photosynthese, stomatären Leitfähigkeit und Transpiration. Nach ca. 12 Minuten begannen die Werte sich zu erholen (Abb. 4.16 A.I und A.II). Die Wiederbewässerung hingegen induzierte zeitverzögert einen Anstieg der zuvor genannten Parameter (Abb. 4.16 B.I und B.II). Bei der zeitgleichen Stimulation mit beiden Reizen kam es zunächst zu

einem schwächeren Einbruch im Verhältnis zum Hitzestimulus und daran anschließend zu einem starken Anstieg im Vergleich zur einzelnen Wiederbewässerung (Abb. 4.16 C.I und C.II). Die interzelluläre CO<sub>2</sub> Konzentration verhält sich meist gegenläufig zu den drei anderen Gaswechselfparametern.

Die Gaswechsel Messkurven des *Zea mays* unterscheiden sich von denen der *Glycine max* L. Pflanzen (Abb. 4.16 vgl. Abb. 4.17).



**Abbildung 4.17: Änderungen des Gaswechsel bei *Zea mays* nach Stimulation der Blattspitze und/oder Wiederbewässerung.** (I) Photosynthese und stomatäre Leitfähigkeit; (II) Interzelluläre  $\text{CO}_2$  Konzentration ( $C_i$ ) und Transpiration; (A) Hitzestimulus: Die Blattspitze wurde 3 s lang durch Hitze stimuliert; (B) Wiederbewässerung: Das Boden-/Wurzelsystem wurde erneut mit 2,5 L  $\text{H}_2\text{O}$  bewässert; (C) Zeitgleiche Wiederbewässerung und Hitzestimulation wie bei A und B. Dargestellt sind typische Gaswechselverläufe aus einer Reihe von Messungen ( $n = 5$ ).

Nach dem Hitzestimulus an *Zea mays* kam es zu einem kurzzeitigen Anstieg der Photosynthese, stomatären Leitfähigkeit und Transpiration, nach dem ein Einbruch der Parameter folgte. Erst nach ca. 40 Minuten begannen die Werte sich zu erholen (Abb. 4.17 A.I und A.II). Die Wiederbewässerung induzierte einen Abfall der Werte, bevor es ab Minute 45 zu einem Anstieg der zuvor genannten Parameter kam (Abb. 4.17 B.I und B.II). Bei

der gleichzeitigen Stimulation mit beiden Reizen kam es zu einem stärkeren Anstieg im Verhältnis zum Hitzestimulus und daran anschließend zu einem Einbruch der Parameter, bevor ein starker Anstieg vergleichbar zur einzelnen Wiederbewässerung zu beobachten war (Abb. 4.16 C.I und C.II). Ebenso wie bei den Messungen an *Glycine max L.* verhielt sich die interzelluläre CO<sub>2</sub> Konzentration gegenläufig zu den drei anderen Gaswechselfparametern.

Insgesamt ergab sich bei der simultanen Stimulation zu denen mit Hitze und Wiederbewässerung einzeln gereizten Pflanzen, ein kombinierter Verlauf der Parameter.

#### 4.2.3 Wassergehaltsbestimmung während des Trockenstresses

Die Töpfe der *Zea mays* Pflanzen wurden während der Austrocknung für den Trockenstress gewogen, um den Wassergehalt berechnen zu können.

**Tabelle 4.1: Bestimmung des Wassergehalts in *Zea mays*.** (n = 6 ± Standardfehler).  
Die Dichte des Wurzelballens mit Erde wurde als 0,4 kg/dm<sup>3</sup> bestimmt.

Zea Sprossgewicht [g]	Zea getrockneter Wurzelballen mit Erde [kg]	Bodenwassergehalt nach 14 Tagen [%]	Bodenwassergehalt vor Wiederbewässerung [%]	Volumen des Bodenwassers vor Wiederbewässerung [Vol. %]
140 ± 7,64	1,42 ± 0,02	70,31 ± 1,23	35,94 ± 2,43	14,38 ± 0,97

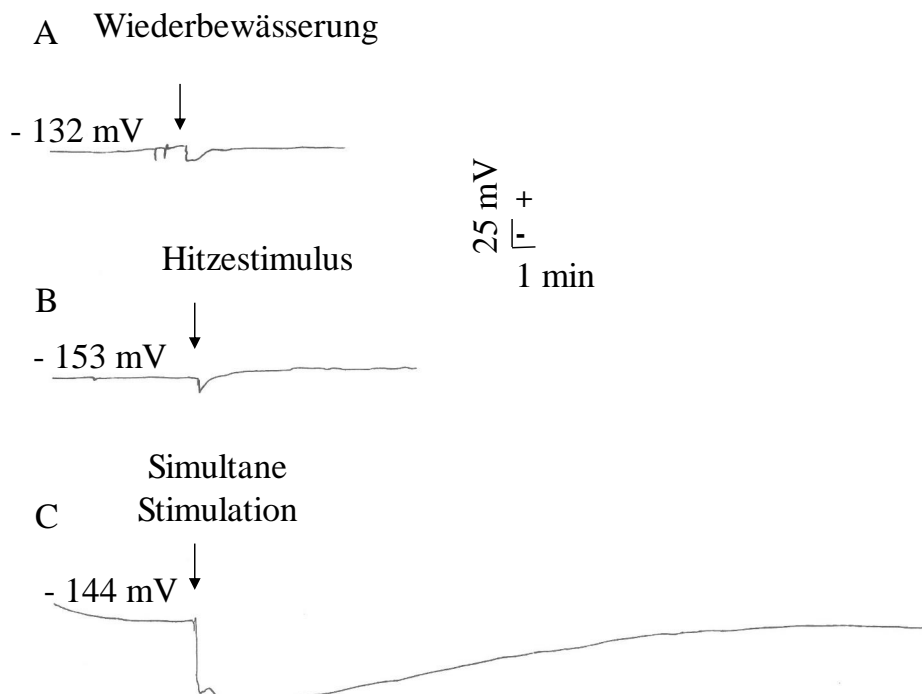
Über die Transpiration der Stomata und des Bodens wurde der Wassergehalt durchschnittlich um 0,100 kg pro Tag reduziert. Nach 14 Tagen waren nur noch 70,31 % ± 1,23 % des Bodenwassers vorhanden (Tab. 4.1). Eine Woche später hatte jede Pflanze einen durchschnittlichen Wassergehalt im Boden von 35,94 % ± 2,43 % (n= 6 ± Standardfehler). Dies entsprach zum Zeitpunkt der Wiederbewässerung 14,38 Vol. % ± 0,97 Vol. % im Boden. Das vollständig getrocknete Bodenwurzelsystem hatte ein Gewicht von 1,42 kg ± 0,02 kg und der *Zea* Spross von 140 g ± 7,64 g.

#### 4.2.4 Elektrophysiologische Analyse zur simultanen Reizverarbeitung

Von Fromm und Fei konnte 1998 durch extrazelluläre Potenzialmessungen ein elektrisches Signal nach der Wiederbewässerung von *Zea mays*, welcher 5 Tage unter Trockenstress gelitten hatte, detektiert werden. Die elektrischen Signale traten vor der Veränderung des Gaswechsels auf und zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die Veränderungen im Gaswechsel nicht auf der Wasseraufnahme, sondern die dadurch induzierten elektrischen Signale zurückzuführen sein müssen (Fromm und Fei, 1998). Das Ziel der folgenden Messungen lag darin, elektrische Signale während des zeitgleichen Reizgebens zu messen.

#### 4.2.4.1 Elektrophysiologische Analyse zur simultanen Reizverarbeitung in *Glycine max L.*

Zunächst wurden intrazelluläre elektrophysiologische Versuche mit trockengestressten *Glycine max L.* durchgeführt. Dafür wurde, wie zuvor beschrieben, die Messapparatur für analoge Potenzialmessungen an ein *Glycine* Blatt angebracht (Kapitel 3.2.5.4). Die Ergebnisse der Messungen sind beispielhaft in Abbildung 4.18 dargestellt. Durch die Wiederbewässerung nach einer Woche unter Trockenstress konnte eine Hyperpolarisation des elektrischen Potenzials induziert werden (Abb. 4.18 A). Der Hitzestimulus erzeugte ebenso eine Hyperpolarisation (Abb. 4.18 B). Durch die gleichzeitige Stimulation beider zuvor verwendeter Reize konnte bei *Glycine* eine deutlich stärkere Hyperpolarisation ausgelöst werden (Abb. 4.18 C).

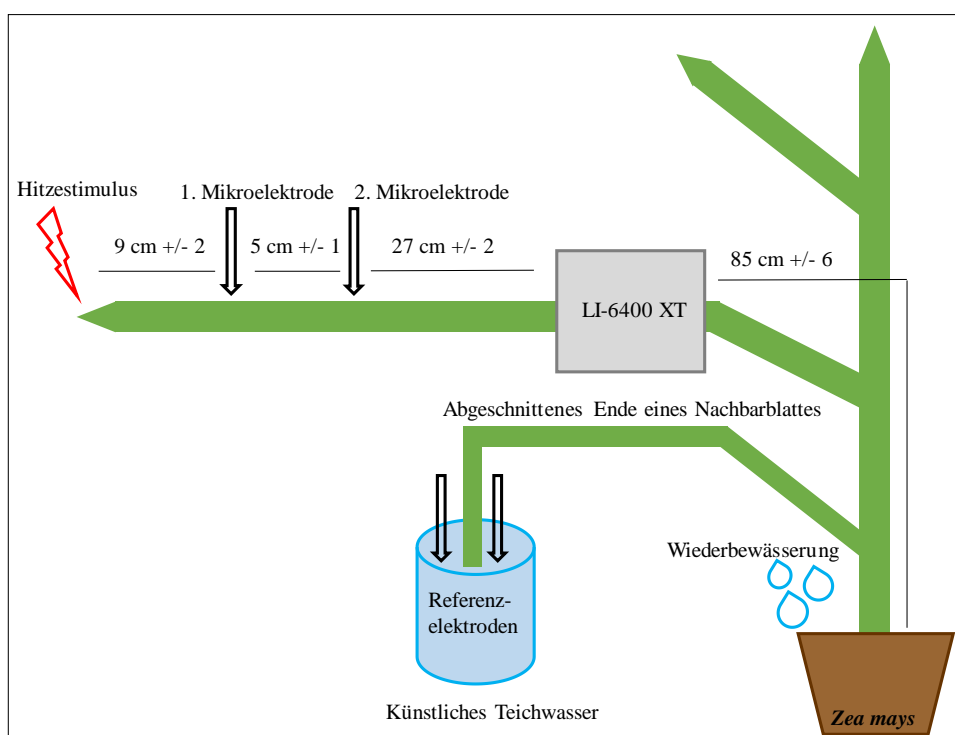


**Abbildung 4.18: Potenzialmessungen intrazellular an *Glycine max L.* Pflanzen.**

(A) Wiederbewässerung des Bodens (2,5 L) induzierte eine vorübergehende Hyperpolarisationsausbreitung in akropetaler Richtung; (B) Stimulation der Spitze durch Hitze (3 s) löste eine Hyperpolarisation in basipetaler Richtung aus; (C) gleichzeitige Stimulation durch Hitze und Wiederbewässern ((A) und (B)) lösten eine starke Hyperpolarisation aus. Ein typischer Verlauf der Messungen ist dargestellt (n = 5).

4.2.4.2 Elektrophysiologische Analyse zur simultanen Reizverarbeitung in *Zea mays*

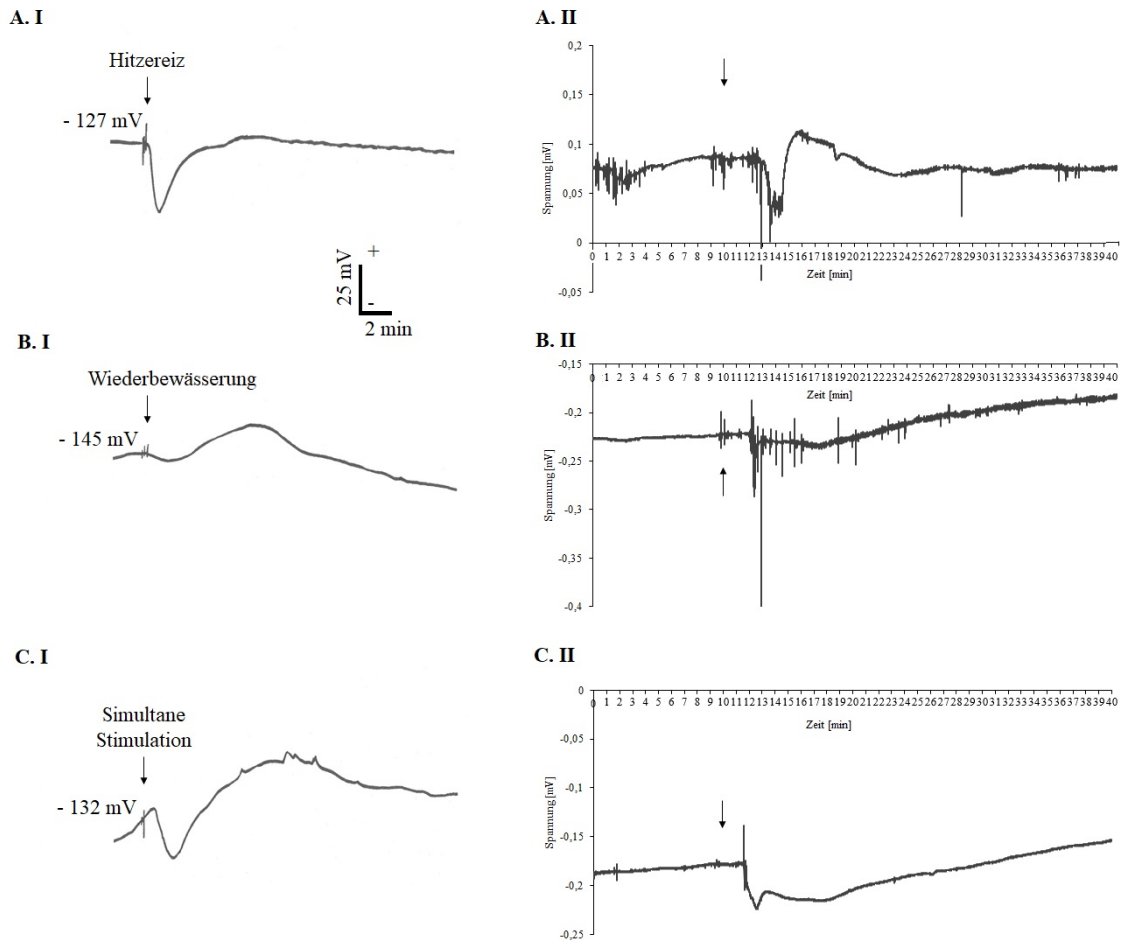
An *Zea mays* Pflanzen war zeitgleich das analoge und digitale Messsystem für intrazelluläre Messungen angeschlossen (siehe Kapitel 3.2.5.4). Dazu wurden selbstgezogene Mikroelektroden (Glaskapillaren), gefüllt mit 500 mM KCl, mit der Spitze in die Mittelrippe des dritten Blattes von oben der *Zea mays* Pflanze in einem Abstand von  $5\text{ cm} \pm 1\text{ cm}$  zueinander eingestochen, an dem gleichzeitig mit dem LI-6400 XT der Gaswechsel (Kapitel 4.2.2) gemessen wurde. Die schematische Darstellung ist in Abb. 4.19 illustriert. Nach Einstellen des Ruhepotenzials (frühestens nach 10 Minuten) wurde sowohl gleichzeitig stimuliert als auch der Einzelreiz beobachtet. Die erste Elektrode war in einem Abstand von  $9\text{ cm} \pm 2\text{ cm}$  zu der Hitze/Feuer stimulierten Blattspitze angebracht. Die Referenzelektroden befanden sich in APW, ebenso wie ein abgeschnittenes Blatt der gemessenen Pflanze.



**Abbildung 4.19: Schema des Aufbaus der kombinierten Reize mit intrazellulärer und Gaswechsellmessung an *Zea mays*.** Angegeben sind die jeweiligen Abstände zwischen den einzelnen Messapparaturen und Stimuli.

In Abbildung 4.20 sind die Messergebnisse an *Zea* dargestellt. Als (I) sind die Messungen mit dem analogen System gekennzeichnet und (II) beschreibt die Messungen mit dem digitalen System. Der Hitzereiz induzierte eine vorübergehende Hyperpolarisation (Abb. 4.20 A), welche zeitverzögert bei der digitalen Messelektrode (näher zum Spross) eintraf (vgl. 4.20 A.I und A.II). Durch die Wiederbewässerung konnte eine Depolarisation ausgelöst

werden (Abb. 4.20 B.I/II). Die zeitgleiche Stimulation mit beiden Reizen erzeugte zunächst eine Hyperpolarisation und im Anschluss eine Depolarisation (Abb. 4.20 C.I/II).



**Abbildung 4.20: Potenzialmessungen intrazellulär an *Zea mays*.** (I) Analoges System; (II) Digitales System. (A.I/II) Stimulation der Spitze durch Hitze (3 s) löst eine Hyperpolarisation aus mit einer Geschwindigkeit von  $1,25 \text{ cm s}^{-1}$  in basipetaler Richtung; (B.I/II) Wiederbewässerung des Bodens (2,5 L) induzierte eine vorübergehende Depolarisationsausbreitung in akropetaler Richtung bei einer Geschwindigkeit von  $3,6 \text{ cm s}^{-1}$ ; (C.I/II) Gleichzeitige Stimulation durch Hitze und Wiederbewässern ((A.I/II) und (B.I/II)) lösten zuerst eine Hyperpolarisation und dann eine vorübergehende Depolarisation mit einer Geschwindigkeit von  $0,61 \text{ cm s}^{-1}$  aus. Ein typischer Verlauf der Messungen ist dargestellt ( $n = 5$ ).

Die unterschiedlichen Reize erzeugten typische Hyper- bzw. Depolarisationen, die mit ihrer jeweiligen Amplitude und Dauer in der folgenden Tabelle aufgeführt sind.



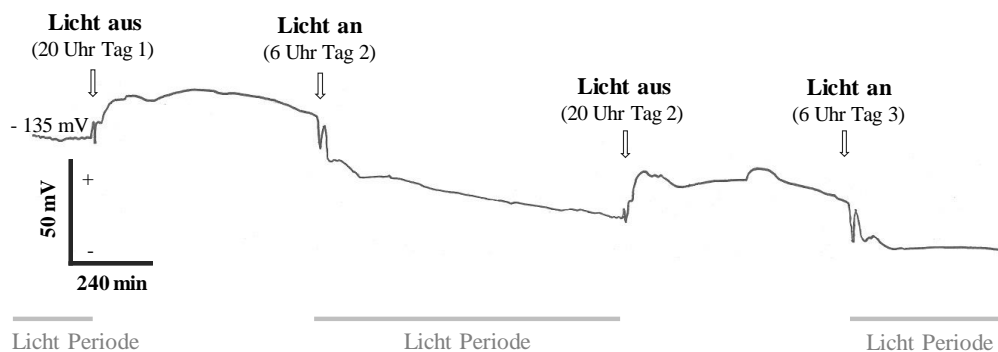
**Tabelle 4.2: Typ des Stimulus mit dem Durchschnitt der Amplitude und Dauer in *Zea mays* ( $n \geq 5 \pm$  Standardfehler).**

Stimulus	Amplitude [mV]	Dauer [min]
Hitzestimulus (n= 5)	$37,64 \pm 9,13$	$2,51 \pm 0,69$
Wiederbewässerung (n= 5)	$17,38 \pm 6,16$	$8,67 \pm 3,52$
Simultane Stimulation (n= 10)	$63,21 \pm 8,04$	$16,54 \pm 0,70$

Der Hitzestimulus erzeugte ein kurzes und im Verhältnis zur Wiederbewässerung starkes Signal (Tab. 4.2 vgl. Abb. 4.20 A). Das Signal der Wiederbewässerung war schwächer, dafür im Verhältnis wesentlich länger (Tab. 4.2 vgl. Abb. 4.20 B). Eine Kombination aus beiden Reizen generierte zunächst das stärkste hyperpolarisierende Signal und danach eine länger andauernde Depolarisation (Tab. 4.2 vgl. Abb. 4.20 C).

#### 4.2.5 Circadianer Rhythmus

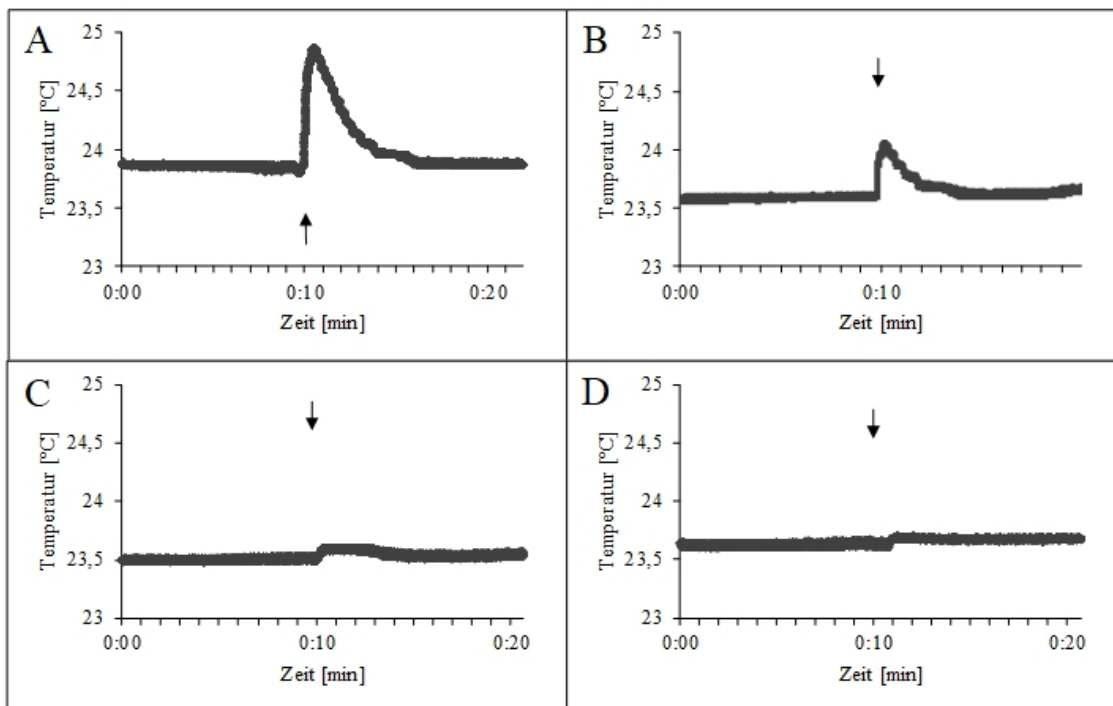
Der tägliche Rhythmus des elektrischen Potentials wurde über 38 h mit Oberflächenelektroden an einem Blatt einer über 3 Wochen mit Trockenstress strapazierten *Zea* Pflanze gemessen. Als Lichtquelle diente eine Quecksilberhalogenidlampe in einem 14 h hell/10 h dunkel Rhythmus. Dabei wurde das Licht um 6 Uhr morgens an- und um 20 Uhr durch eine Zeitschaltuhr ausgeschaltet. Die Messergebnisse sind in Abb. 4.21 dargestellt. Ein deutlicher tageszeitlicher Verlauf war zu erkennen. Eine Depolarisation erfolgte, sobald das Licht ausgeschaltet wurde und eine Repolarisation beim Anschalten der Beleuchtung. Durch das An- bzw. Ausschalten wurde jeweils eine Hyperpolarisation induziert. Die elektrischen Reaktionen zeigten eindeutig, dass der Trockenstress nicht für letale Bedingungen sorgte.



**Abbildung 4.21: Circadianer Rhythmus bei *Zea mays*.** Jeweils mit einem Pfeil sind die Zeiten markiert zu denen das Licht an- bzw. ausging.

#### 4.2.6 Temperaturmessungen an der Blattoberfläche beim Hitzestimulus

Um zu überprüfen, ob der Feuerreizung Temperaturveränderungen weitergeleitet werden, wurden Temperaturmessungen an der Blattoberfläche mit dem Polygraphen (Kapitel 3.2.6) dargestellt. Es ergibt sich folgender Temperaturverlauf: je weiter der Messsensor des Polygraphen von der hitzestimulierten Stelle entfernt ist (siehe Abb. 4.22 A – D), desto geringer ist die Temperaturbeeinflussung durch die Flamme.



**Abbildung 4.22: Temperaturverläufe an *Zea mays* nach Erhitzung der Blattspitze.**

Jeweilige Angabe des Abstandes zwischen dem Mittelpunkt des Hitzestimulus an der Blattspitze und dem Sensor; (A) 1 cm; (B) 2 cm, (C) 5 cm; (D) 7 cm. Der Reiz erfolgte jeweils nach 10 Minuten ( $n=4$ ).

Maximal wurde eine Temperaturveränderung/-zunahme von  $1^{\circ}\text{C}$  durch den Polygraphen gemessen bei einem Abstand von 1 cm zur Flamme (Abb. 4.22 A). Minimal beträgt die Temperaturerhöhung  $0,05^{\circ}\text{C}$  bei einem Abstand vom 9 cm (Abb. 4.23). Da für die Experimente mit *Zea mays*, bei denen einzeln mit Hitze/Feuer gereizt oder zeitgleich eine Wiederbewässerung und Hitze induziert wurde, ein Abstand von  $9 \pm 2$  cm zwischen den Elektroden und dem Hitzestimulus gewählt wurde (Abb. 4.22 D; 7 cm entspricht  $0,08^{\circ}\text{C}$ ), waren die durch die Flamme entstandenen Temperaturveränderungen im Bezug auf die Potenzialmessungen zu vernachlässigen.

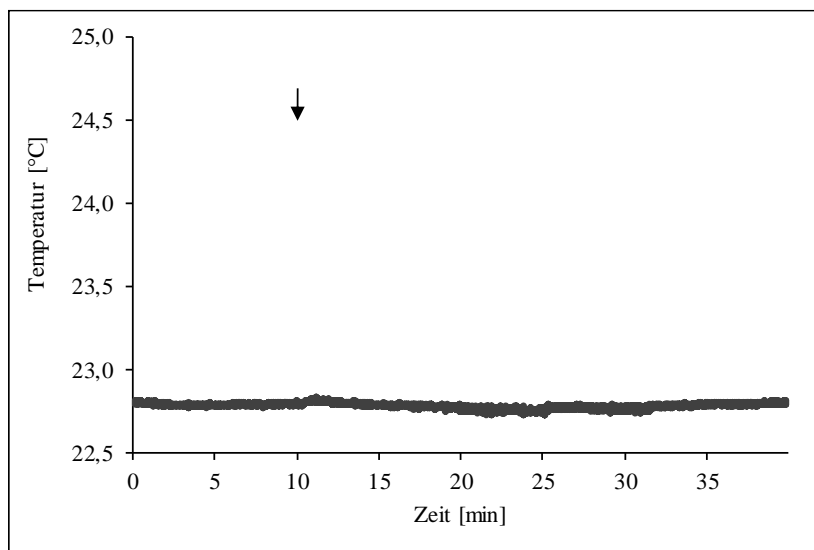
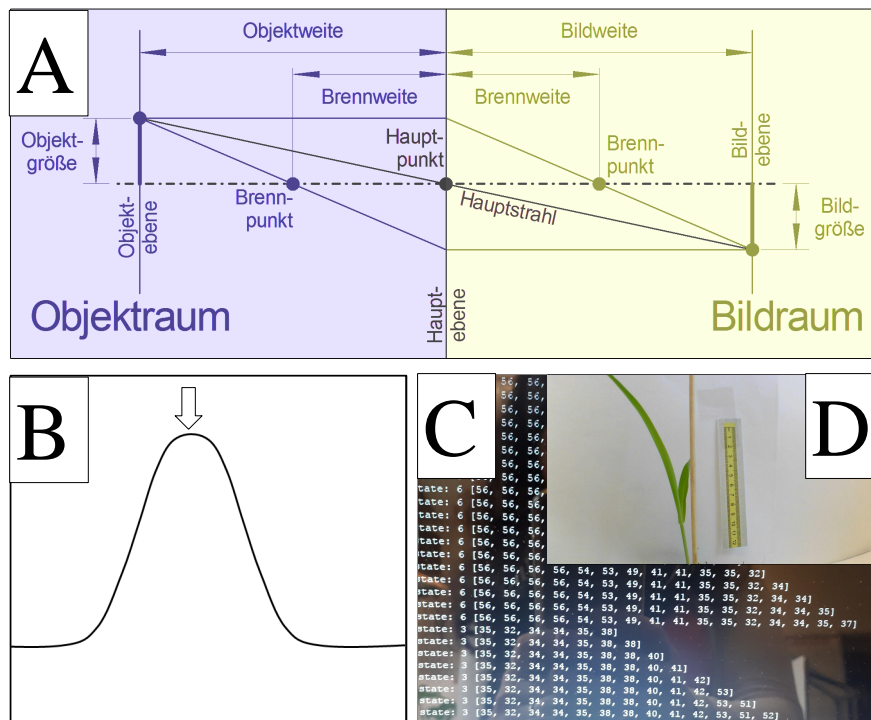


Abbildung 4.23: Darstellung des mittleren Abstandes (9 cm) der gemessenen Temperaturen an *Zea mays*. Der Reiz erfolgte nach 10 Minuten (n= 5).

#### 4.2.7 Status Beschreibung im Python Programm für die Einstellung des Fokus im automatisierten Bildgebungsverfahren

Die optimale Fokuseinstellung wird ermittelt, in dem absolute Schärfewerte gemessen werden (Abb. 4.24 C). Dafür wurde die Schärfefunktion der Kamera verwendet. Wichtige weitere Faktoren sind die Brennweite (Abb. 4.24 A) und der Kontrast. Letzterer ist abhängig von den Lichtverhältnissen, dem Hintergrund und dem zu fotografierenden Objekt selbst. Für den Sensor der Kamera ist entscheidend, dass er auf der Bildebene liegt. Vereinfacht gesagt, erstellt das Programm eine Bilddatei, wenn eine möglichst hohe absolute Schärfe erreicht wird. Dafür wurde das im Folgenden geschriebene Programm mit Status 0 – 6 verwendet (siehe Abb. 4.25)(siehe Anhang A.2). Es kam häufig zu Messfehlern bei den Kontrastwerten, sodass Strategien entwickelt werden mussten, um diese zu vermeiden.



**Abbildung 4.24: Optik im Bezug auf Bildschärfe.** (A) Darstellung der Brennweite und Bild- zu Objektgröße (lizenzfreie Abbildung (Bautsch, 2015)); (B) Schärfeverlauf. Das Maximum der Glockenkurve wurde mit einem Pfeil gekennzeichnet; (C) Gemessene absolute Schärfewerte durch das Autofokusprogramm; (D) Fotografie durch das Autofokusprogramm einer Maispflanze.

Die erste Strategie war, dass zum letzten absoluten Messwert nur Werte akzeptiert werden, die um maximal  $\pm 3$  abweichen (Status 0 bis 2). Da die Schärfe eine Glockenkurve beschreibt, tritt eine Veränderung der Werte schneller ein, je mehr man sich dem Scheitelpunkt nähert (Abb. 4.24 B). Deshalb wurden ab Status 3 Werte akzeptiert, die um maximal  $\pm 25$  vom vorangegangenen absoluten Wert abweichen. Für den Status 6 wurde ebenso eine Abweichung von  $\pm 25$  definiert.

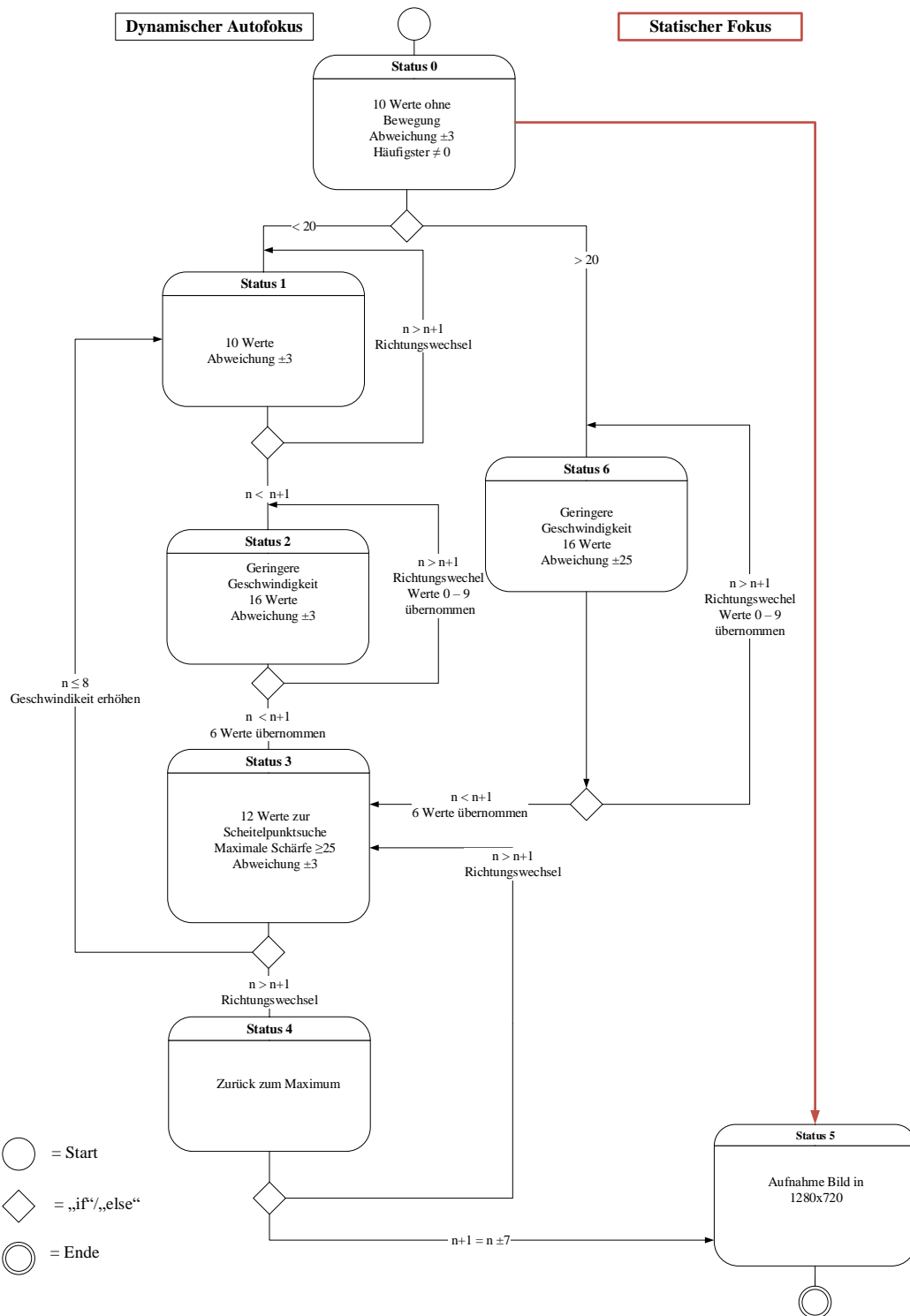


Abbildung 4.25: Schema der Fokusprogramme. Dargestellt ist der jeweilige Status mit der Entscheidungsgrundlage und der Anzahl der aufgenommenen Werte. In rot markiert ist der Weg des statischen Fokusprogramm.

Die zweite Strategie war, dass ein fester Status 0 eingebaut wurde, bei dem, ohne eine Veränderung des Fokus, 10 absolute Werte gemessen wurden, um zu ermitteln, welches der aktuelle Schärfewert ist. Aus diesen 10 Messwerten wurde der am häufigsten vorkommende absolute Wert, der  $\neq$  Null war, ausgelesen und mit in den Status 1 transferiert. Für den Fall, dass der am häufigsten vorkommende Wert bereits größer als 20 war, wurde direkt in Status 6 gesprungen, der zu einem späteren Zeitpunkt erläutert wird.

Im Status 1 werden 10 Werte aufgenommen, dabei wird bei den neueren absoluten Werten geschaut, ob diese größer oder kleiner als die vorangegangenen Werte sind. Sind diese größer, dann wird die Schärfe besser und die Linse bzw. der Fokus wird in die richtige Richtung gedreht. Sind die Werte kleiner, dann muss ein Richtungswechsel erfolgen. Sollte der Richtungswechsel bereits passiert sein, und die neuen Werte sind größer oder genauso groß wie die alten, dann wird in Status 2 gewechselt.

Bei Status 2 wird die Geschwindigkeit des Motors verringert, da davon ausgegangen wird, dass die Bewegung in der richtigen Drehrichtung stattfindet. Es werden 16 Werte aufgenommen und vom Programm verglichen, ob die Aktuellen wieder größer oder kleiner als die Vorangegangenen sind. Beim Anstieg der Messwerte handelt es sich um die korrekte Drehrichtung, sodass die letzten 6 absoluten Werte in Status 3 transferiert werden. Werden die Messwerte wider Erwarten doch kleiner, erfolgt ein Richtungswechsel, bei dem die Werte von 0 – 9 behalten werden.

Bei Status 6 wird wie bei Status 2 die Geschwindigkeit des Motors verringert. Im Prinzip ist Status 6 wie Status 2, mit der Ausnahme, dass Status 1 umgangen wird. Es werden 16 absolute Werte aufgenommen und geschaut, ob die Aktuellen wieder größer oder kleiner als die Vorangegangenen sind. Ist ein Anstieg zu erkennen, handelt es sich weiterhin um die korrekte Drehrichtung und die letzten 6 Werte werden in Status 3 transferiert. Werden die Messwerte doch kleiner, erfolgt ein Richtungswechsel bei dem die Werte von 0 – 9 behalten werden.

Bei Status 3 werden 12 Werte aufgenommen. Es wird nun der Scheitelpunkt gesucht und dieser soll überschritten werden, damit die maximale absolute Schärfe ermittelt werden kann. Die maximale Schärfe wird ausgelesen und der absolute Wert sollte  $\geq 25$  sein, wenn dann die aktuellen Werte noch kleiner als die Vorangegangenen sind, dann wird ein Richtungswechsel vollführt und in Status 4 gewechselt. Da dies bedeutet, dass der Scheitelpunkt überschritten wurde.

Der 2. Abschnitt von Status 3 dient dem Eliminieren von Fehlern. Wenn die Werte sehr klein sind, dann wurde nach Status 2 zu weit gedreht und der letzte Wert war  $\leq 8$ . Es wird die Drehgeschwindigkeit erneut erhöht und zurück in Status 1 gewechselt.

Bei Status 4 wird versucht, dass die Schärfe wieder dem zuvor maximal gemessenen absoluten Wert angenähert wird. Sobald der letzte gemessene Wert um  $\pm 7$  vom zuvor bestimmten Maximum abweicht wird in Status 5 übergegangen. Ebenso wurde in diesem

Schritt eine Fehlerkorrektur eingebaut. Falls die Werte immer kleiner werden und sich nicht dem ursprünglichen Maximalwert annähern, wird ein Richtungswechsel induziert. Es werden die Werte wie in Status 1 behalten. Anschließend findet ein Transfer in Status 3 statt.

Bei Status 5 handelt es sich um einen festen Status, bei dem das Bild aufgenommen wird. Dafür wird zuvor die Bildauflösung auf 1280 x 720 Pixel hochgestellt und im Anschluss das Bild als .jpeg mit fortlaufender Nummer gespeichert (Abb. 4.24 D).

Nach Beendigung des Programms wird die nächste Position angefahren und das Programm von Neuem gestartet.

Letztendlich wurde eine Variante verwendet, bei der der Autofokus nicht benutzt wird, sondern mit einem statischen Fokus Bilder gemacht werden. Dafür wurde das Autofokusprogramm modifiziert. Im statischen Programm wird direkt nach Status 0 in den Status 5 gewechselt (Abb. 4.25), unabhängig davon wie groß die gemessenen Werte waren. Die Fokussmotoren waren deaktiviert.

Die aus dem automatisierten Bildgebungsverfahren gewonnenen Bilder wurden über das Programm „Windows Movie Maker“ zu einer Videosequenz zusammengefügt (Tab. 3.5).

#### 4.2.8 Wuchsveränderung von *Glycine max L.* Pflanzen durch unterschiedliche Reize

Für Vergleiche mit der simultanen Stimulation von Pflanzen wurden in einem Zeitraum nach dem Setzen des Reizes möglichst viele Bilder gemacht und der Wuchs an *Glycine max L.* beobachtet. Es gab die Varianten Hitzestimulus, Trockenstress mit anschließender Wiederbewässerung, simultane Stimulation beider zuvor genannter Reize sowie je eine negative und positive Kontrolle. Die negative Kontrolle wurde im gesamten Zeitraum nicht bewässert, im Gegensatz zur positiven Kontrolle, die gut bewässert und frei von anderen Stimuli war. Da von Canny 1975 gezeigt wurde, dass Zucker eine Geschwindigkeit von bis zu 100 cm pro Stunde haben (Canny, 1975) und Koziolk et al. (2003) ausführten, dass chemische Reize eine Geschwindigkeit von 50 – 100 cm pro Stunde haben (Koziolk et al., 2003), sollte ursprünglich verhindert werden, dass diese die eventuelle Wuchsveränderung induzieren.

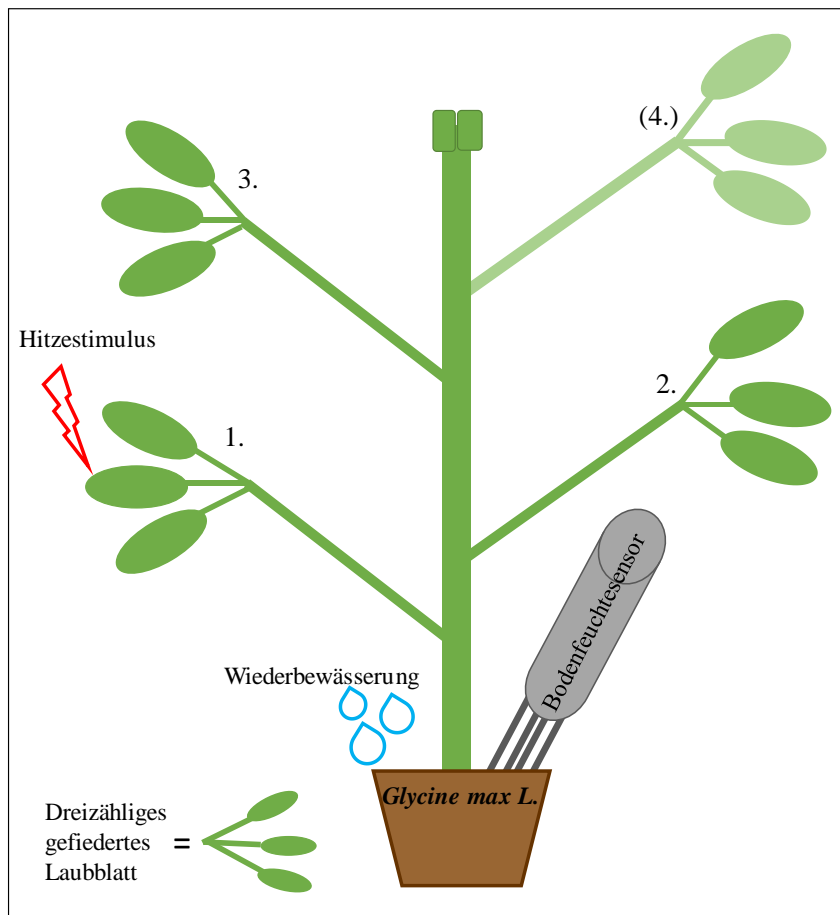
Wenn mehr als eine Pflanze, nach der Aussaat von *Glycine max L.*, im Topf gekeimt war, wurden diese vereinzelt und die überschüssigen Individuen in separate Töpfe pikiert. Die pikierten Pflanzen wurden beobachtet, ob ihnen diese Prozedur geschadet hatte. Da trotz vorsichtigen Vorgehens nicht ausgeschlossen werden kann, dass die Wurzel beschädigt wurde. Allein die Standortveränderung kann Stress erzeugen, da es sich bei Pflanzen um sessile Lebewesen handelt.

Obwohl alle Samen zur selben Zeit für die Keimung ausgebracht wurden, ergaben sich Unterschiede im Entwicklungsstadium der Pflanzen. Deshalb wurden Gruppen von jeweils

5 Individuen gebildet, die bezüglich Größe und Habitus (Blattanzahl) zueinander passten. Bis zum Tag des Reizes entsprachen die Hitzereizpflanzen den äußeren Bedingungen nach den positiven Kontrollpflanzen, da bei beiden Gruppen regelmäßig bewässert wurde. Ebenso entsprachen die trockengestressten Pflanzen denen für die zeitgleiche Stimulation vorgesehen Pflanzen und der negativen Kontrolle, da diese drei Gruppen einem mehrtägigen Trockenstress ausgesetzt waren.

*Glycine max L.* ist nicht vergleichbar Trockenstress resistent wie *Zea mays*, deshalb musste das Austrocknen strenger überwacht werden, um ein Absterben der Pflanzen zu verhindern. Bei den *Glycine max L.* Pflanzen wurden vor der Wiederbewässerung Bodenfeuchtemessungen durchgeführt. Dafür wurde der ThetaProbe ML2x Bodenfeuchte Sensor verwendet, der den Bodenfeuchtegehalt in Volumenprozent (Vol %) angibt. Der Bodenfeuchtegehalt sollte für die unter Trockenstress leidenden Pflanzen zwischen 10 % – 20 % liegen, um garantieren zu können, dass für die Pflanze fühlbarer Trockenstress vorlag (Abb. 4.26). Dies war meist spätestens nach einer Woche der Fall. Im Anschluss wurde zusätzlich bei den wiederbewässerten Pflanzen der Bodenfeuchtegehalt überprüft, welcher bei 30 – 40 %, wie bei den gut bewässerten Pflanzen, liegen sollte. Der Hitzereiz erfolgte immer an dem ersten echten Blatt, d.h. nicht an den Keimblättern.



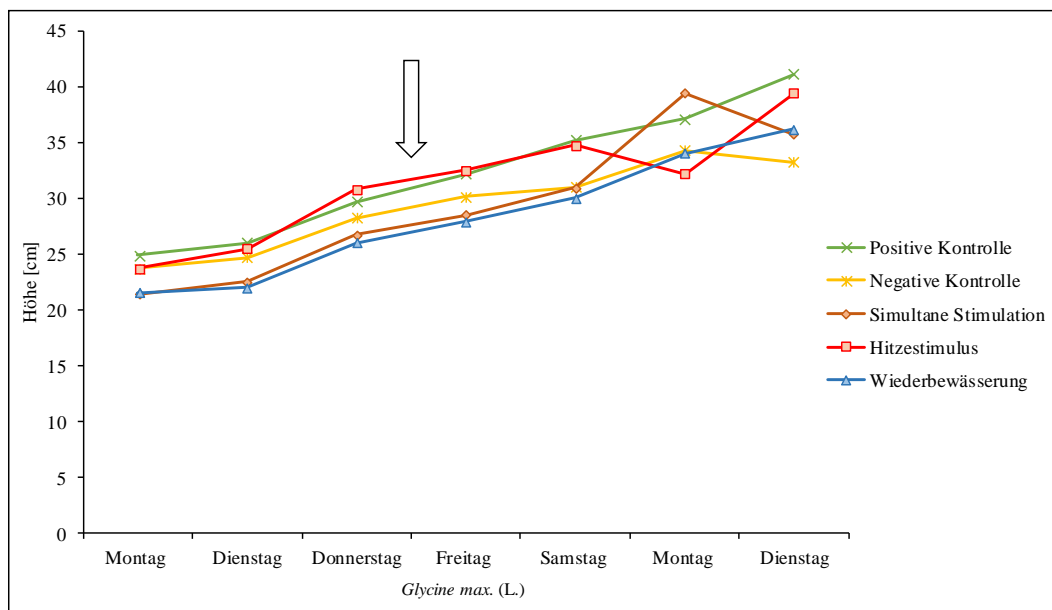


**Abbildung 4.26: Schema des Aufbaus der kombinierten Reize an *Glycine max L.***  
 Mit Zahlen sind die jeweiligen dreizähligen gefiederten Laubblätter dargestellt. Das 4. dreizählige gefiederte Blatt war nicht bei allen Individuen am Ende des Versuches entwickelt.

Analog dazu wurde per Hand das Wachstum, der unterschiedlichen Bedingungen ausgesetzten Pflanzen, beobachtet sowie täglich vermessen, um Kurven des prozentualen Wachstums über die Versuchsdauer erstellen zu können.

In [Abbildung 4.27](#) ist beispielhaft am Wuchs einer Gruppe, von den 32 untersuchten Pflanzen, dargestellt, wie die signifikanten Unterschiede zueinander betrachtet wurden. Dafür wurde über den gemessenen Zeitraum des Versuches mit den jeweiligen Werten der Gruppe z. B. positive Kontrolle zu allen anderen, die Signifikanz berechnet. Somit konnte am Ende gesagt werden, welche Gruppen signifikant größer waren als die anderen. Diese Vorgehensweise wurde für alle Individuen, Varianten und Wiederholungen angewendet, sodass als maximale Anzahl 128 bzw. bei der negativen Kontrolle 84 hätten entstehen können, wenn eine Variante immer größer gewesen wäre als die Anderen.

Es ergab sich ein signifikanter Unterschied in der Gesamthöhe der Pflanzen von 27:2:19:25:11 bei positiver Kontrolle: negativer Kontrolle: simultane Stimulation: Hitzestimulus: Wiederbewässerung. Die gleichzeitig gereizten *Glycine max L.* Pflanzen zeigten einen signifikanten Höhenunterschied zu den anderen Gruppen in 19 Fällen. Die Kontrollpflanzen waren in 27 Fällen signifikant größer. Dies entsprach ungefähr dem signifikanten Höhenunterschied der Hitze stimulierten Individuen (25 Fälle). Aller Trockenstress, ob zeitweise, wie bei der Wiederbewässerung, oder permanent, wie bei der negativen Kontrolle löste eine zu vernachlässigende Wuchsinduktion von 11 bzw. 2 Individuen aus.



**Abbildung 4.27: Wuchsbeeinflussung durch die Stimuli** (Pfeil). Beispielhaft an Gruppe 1 des *Glycine max L.* Insgesamt wurden 32 Gruppen untersucht.

*Glycine max L.* bildet immer wechselständig am Stängel angeordnete dreizählige gefiederte Laubblätter. Es gab maximal 3 bzw. 4 solcher dreizähligen gefiederten Blätter (s. Abb. 4.26). Bei der Analyse der signifikanten Unterschiede der einzelnen Blätter in der Größe zueinander wurde jeweils beginnend von der Blattspitze über die Hauptblattader zum Blattbeginn der Durchmesser des jeweils mittleren dreizähligen gefiederten Blattes vermessen. Es hat sich so ein Verhältnis von 55:30:67:61:36 für die positive Kontrolle: negative Kontrolle: simultane Stimulation: Hitzestimulus: Wiederbewässerung zueinander ergeben. Dabei wurden jeweils wie zuvor alle Individuen in den jeweiligen Gruppen zueinander mit ihrem Blattwuchs betrachtet. Diese Ergebnisse legen nahe, dass der Feuerreiz eine geringfügige Stimulation im Blattwuchs gegenüber der positiven Kontrolle induziert. Trockenstress hingegen sorgte für den gegenteiligen Effekt.

Bei den prozentualen Wachstumsmessungen ergab sich für *Glycine max L.*, dass das 1. mittlere dreizählige gefiederte Laubblatt bei einer Größe von 3 bis 5 cm stagnierte. Ebenso vermehrte sich die Blattanzahl nur langsam. Da die Analyse der signifikanten Unterschiede über den Versuchszeitraum zueinander nicht sehr aussagekräftig waren, wurde jeweils die prozentuale Ab- bzw. Zunahme der Parameter vor und nach dem Reiz berechnet und betrachtet. Für die Wuchsinduktion/-hemmung nach dem Reiz wurde nur das 2te dreizählige gefiederte Blatt von unten und davon das mittlere Blatt betrachtet. Dieses war bei allen Pflanzen ausgebildet und konnte für die Vergleichbarkeit des Wuchsverhaltens der Blätter untersucht werden.

Um die Ergebnisse übersichtlicher zu gestalten, wurde die Wuchsveränderung jeweils im Vergleich zur positiven Kontrolle betrachtet. So kann dargestellt werden, ob andere Behandlungsmethoden einen besseren oder schlechteren Wuchs hervorrufen (Tab. 4.3).

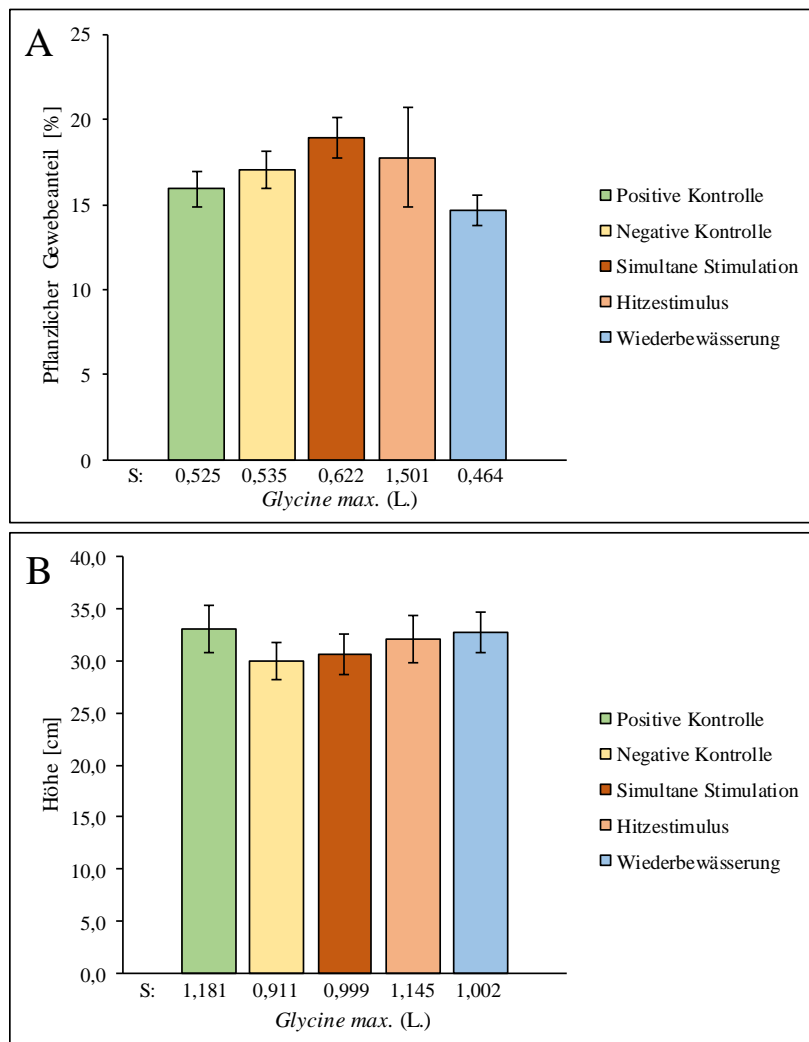
**Tabelle 4.3: Prozentuale Veränderungen der Gruppen von *Glycine max L.*** In Klammern sind die prozentualen Werte bezogen auf die Veränderung im Verhältnis zur positiven Kontrolle dargestellt. Das Vorzeichen beschreibt jeweils ob die Änderungen stärker oder schwächer im Vergleich zur positiven Kontrolle war.

	positive Kontrolle	simultane Stimulation	Hitzestimulus	Wiederbewässerung	negative Kontrolle
Gesamtanzahl	32	32	32	32	21
<b>Induktion</b>					
Höhe	12	12 ( $\pm 0$ %)	6 (-18,7 %)	19 (+21,9 %)	1 (-32,7 %)
Durchmesser des 2. Blattes	13	18 (+15,7 %)	6 (-22,0 %)	17 (+12,5 %)	6 (-12,0 %)
<b>Hemmung</b>					
Höhe	9	22 (+40,7 %)	16 (+21,9 %)	7 (-6,2 %)	13 (+33,8 %)
Durchmesser des 2. Blattes	7	10 (+9,4 %)	20 (+40,6 %)	8 (+3,1 %)	9 (+21,0 %)

Bei Betrachtung der Höhenmessungen der *Glycine max L.* Pflanzen, als Antwort auf die unterschiedlichen Reize jeweils in Relation zur positiven Kontrolle, ergibt sich ein eindeutiges Bild (siehe Tab. 4.3). Durch den Hitzestimulus erfolgte nur halb so oft wie bei der positiven Kontrolle eine Induktion und genauso oft eine Hemmung (bei  $\sim 20$  % der Individuen). Die Wiederbewässerung nach Trockenstress verursachte bei  $\sim 22$  % der Individuen im Vergleich zur positiven Kontrolle eine Wuchsinduktion im Meristem. Nur bei  $\sim 6$  % nahm der Wuchs nach dem Reiz ab. Diese Wuchsabnahme ist schwächer als die der positiven Kontrollpflanzen. Bei  $\sim 41$  % der Individuen induzierte das Reizen mit beiden Stimuli zeitgleich eine Hemmung im Vergleich zur positiven Kontrolle des Wuchses. Im Bezug auf den Wuchs des 2. Blattes ergab sich folgendes Bild: Alle Gruppen induzierten gegenüber der positiven Kontrolle eine häufigere Hemmung, wobei diese teilweise selten stattfand bei der simultanen Stimulation mit  $\sim 9$  %, der Wiederbewässerung mit  $\sim 3$  % oder vermehrt, wie bei der negativen Kontrolle mit  $\sim 21$  % und beim Hitzestimulus mit

~ 41 %. Eine verstärkte Wuchsinduktion war nur bei den gleichzeitig mit beiden Reizen behandelten Individuen und den unter Trockenstressleidenden zu beobachten (simultan: ~ 16 %; Trockenstress: ~ 13 %). Der Hitzestimulus und die negative Kontrolle zeigten eine verringerte Wuchsinduktion in der Häufigkeit gegenüber der positiven Kontrolle von ~ 22 % bzw. ~ 12 %.

Für den Vergleich inwiefern die unterschiedlichen Stimuli einen Einfluss auf die Biomasse des pflanzlichen Gewebes der *Glycine max L.* Pflanzen hatten, wurde nach der Ernte aus dem Frisch- und Trockengewicht der prozentuale Anteile des pflanzlichen Materials am Frischgewicht berechnet. Vergleicht man diesen nun mit der durchschnittlichen Höhe der unterschiedlichen Gruppen (Abb. 4.28 B), dann ergibt sich, dass auf den ersten Blick eine negative Korrelation zwischen der Höhe und dem Biomasse Anteil in der Pflanze besteht. Nur die negative Kontrolle hatte mehr Biomasse gebildet, als auf Grundlage der Höhe erwartet wurde. Dieser Effekt könnte dadurch entstanden sein, dass an dem Wochenende vor der Ernte mit einer geringen Menge die negative Kontrolle gegossen wurde, um zu verhindern, dass diese, seit mehr als 5 Tagen nicht mit Wasser versorgten Pflanzen, absterben. Zur Veranschaulichung, ob die entstandenen Unterschiede signifikant sind, wurde jeweils das Konfidenzniveau bei 95 % betrachtet (siehe Kapitel 3.2.14.6).



**Abbildung 4.28: Ernteparameter des Reizversuches an *Glycine max L.*** (A) Pflanzlicher Gewebeanteil am Frischgewicht; (B) Höhe bei der Ernte. Die Datenpunkte repräsentieren die Mittelwerte  $n = 24$  bzw.  $16$  (negative Kontrolle)  $\pm$  Konfidenzniveau (95 %). Mit S ist der jeweilige Standardfehler dargestellt.

Betrachtet man den pflanzlichen Gewebeanteil am Frischgewicht (Abb. 4.28 A), dann ist dieser bei den zeitgleich stimulierten Pflanzen signifikant größer als in der positiven Kontrolle. Gegenüber den nach Trockenstress wiederbewässerten Pflanzen ist er ebenso signifikant größer. Nur gegenüber den durch Hitze stimulierten Pflanzen und der negativen Kontrolle ergab sich ein Unterschied, der nicht signifikant ist. Zu den trockengestressten Pflanzen ist ebenfalls von der Gruppe der negativen Kontrolle aus ein signifikanter Unterschied festzustellen.

Die Ergebnisse der Höhenmessung unter Betrachtung der Konfidenzniveaus bei 95 % überraschen, da es bei allen Gruppen zu einer Überlagerung dieser kam und somit keine signifikanten Unterschiede in den Behandlungen zu finden waren.

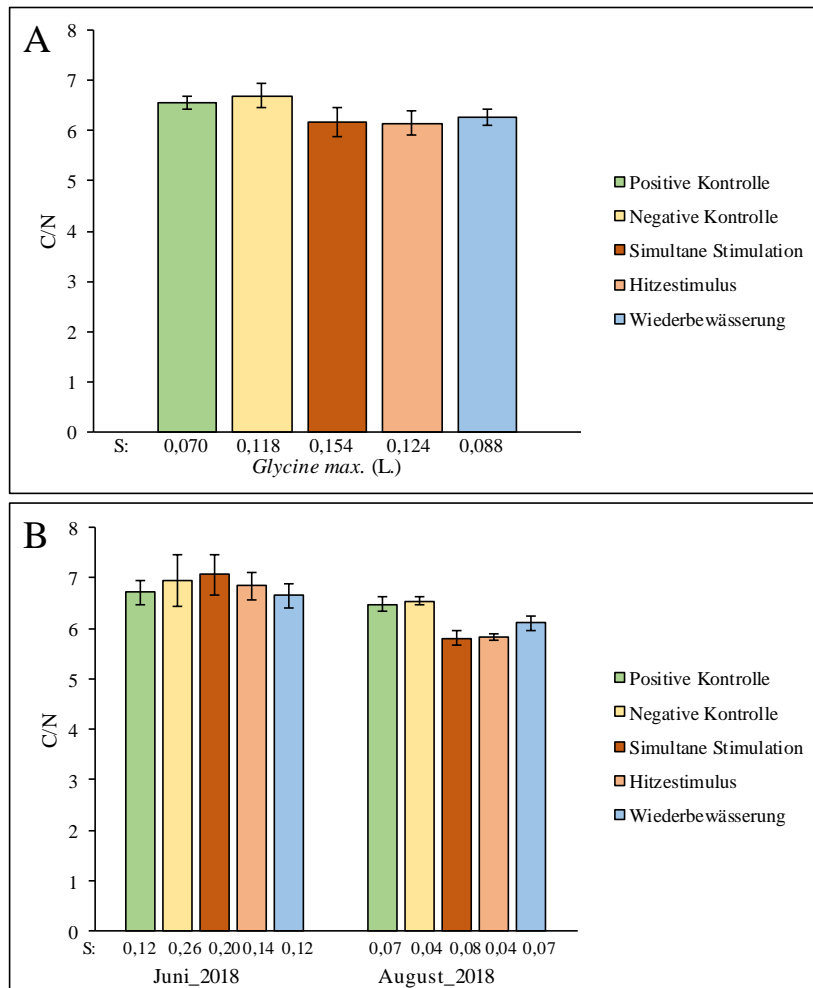
Insgesamt hat die Untersuchung der Wuchsveränderungen von *Glycine max L.* durch die verwendeten Reize folgende Ergebnisse geliefert:

- Gesamtzeitraum Höhenwachstum: Alle vermindert gegenüber der positiven Kontrolle, bei Trockenstress (Wiederbewässerung und negative Kontrolle) stärker
- Gesamtzeitraum Blätterwachstum: Stärkerer Wuchs durch Feuerreiz (Hitze stimulus und simultane Stimulation), durch Trockenstress (Wiederbewässerung und negative Kontrolle) vermindert
- Prozentuale Veränderung nach dem Reiz im Höhenwachstum: Zuwachs der Gruppe Wiederbewässerung, verminderter Wuchs bei den anderen gegenüber der positiven Kontrolle
- Prozentuale Veränderung nach dem Reiz im Blätterwachstum: Zuwachs nach Wiederbewässerung (Wiederbewässerung und s. Stimulation), Hemmung durch Hitze stimulus einzeln und negative Kontrolle
- Ernte: Keine signifikanten Unterschiede in der Höhe und dem Frisch-/Trockengewicht

#### 4.2.8.1 C/N Analyse von *Glycine max L.*

Bei *Glycine max L.* konnten im ersten Durchlauf 5 Proben je Behandlung aus 8 Pflanzen für die Elementaranalyse (Kapitel 3.2.10) erstellt werden. Dabei mussten nur bei den kleineren Gruppen jeweils 2 bzw. 3 Pflanzen zusammengefasst werden.

In Abbildung 4.29 wurden die gemessenen Unterschiede in den C/N Quotienten der verschiedenen Behandlungen dargestellt. Jeweils ist der Unterschied zur zeitgleichen Stimulation von Bedeutung. Da Abb. 4.29 A eine Zusammenfassung der Ergebnisse von Abb. 4.29 B ist, werden im Folgenden die Ergebnisse von Abb. 4.29 B näher betrachtet. Es handelt sich bei dem C/N Gehalt um einen Quotienten. Deshalb kann eine Erhöhung dieses sowohl durch einen höheren Kohlenstoff- als auch durch einen geringeren Stickstoffanteil zustande kommen. Wie zuvor erwähnt sind die von der Elementaranalyse gelieferten Ergebnisse in Prozenten angegeben, sodass Schwankungen unter 0,1 % als gleiche Werte betrachtet wurden.



**Abbildung 4.29: C/N Quotient von *Glycine max L.*** Aus 2 Pflanzen wurde eine Probe je Bedingung gewonnen. (A) Darstellung der Ergebnisse beider Durchläufe zusammen; (B) Darstellung der C/N Quotienten aufgeteilt nach beiden Versuchsdurchläufen. Die Datenpunkte repräsentieren die Mittelwerte  $n = 5$  (Juni\_2018);  $n = 10 \pm 2$  (August\_2018) jeweils  $\pm$  Konfidenzniveau (95 %). Mit S ist der jeweilige Standardfehler dargestellt.

Im Juni ergaben sich keine signifikanten Unterschiede, bedingt durch eine geringe Probengröße und damit einhergehend breiteren Konfidenzniveaus.

Im August hingegen waren die Unterschiede eindeutig durch nicht überlagernde Konfidenzniveaus erkennbar. Die zeitgleich stimulierten Pflanzen zeigten eine höhere N- und C-Konzentration im Verhältnis zu den wiederbewässerten Pflanzen. Dennoch ergab sich ein geringerer Wert im Quotienten. Zusätzlich war im August, bezogen auf die simultane Stimulation, ein signifikant geringerer Anteil im C/N Quotienten zu den Kontrollen zu finden. Die Behandlung mit beiden Reizen wies mehr Stickstoff bei zeitgleich geringerer

Kohlenstoffkonzentration im Vergleich zu den Kontrollen (positiver sowie negativer) auf. Insgesamt ergaben sich heterogene Ergebnisse bezogen auf die unterschiedlichen Behandlungen.

#### 4.2.9 Wuchsveränderung von *Zea mays* Pflanzen durch unterschiedliche Reize

Um zu überprüfen, ob eine stärkere Induktion durch die Wiederbewässerung nach Trockenstress und eine ebenso stärkere Hemmung der hitzestimulierten Individuen auf andere Arten zu übertragen ist, wurde das Experiment mit *Zea Mays* wiederholt.

Die hitzestimulierten Pflanzen wurden am 1. Blatt mit einem Feuerzeug für 3 sec. gereizt, ebenso wie die Pflanzen der gleichzeitigen Stimulation.

Für die Analyse der signifikanten Unterschiede der einzelnen Blätter in der Größe zueinander wurde das gleiche Verfahren wie bei *Glycine max L.* angewendet (s. Kapitel 4.2.8, Abb. 4.27). Es hat sich ein Verhältnis von 60:21:54:36:30 für positive Kontrolle: negative Kontrolle: simultane Stimulation: Hitzestimulus: Wiederbewässerung zueinander ergeben. Dabei hätten in diesem Fall als maximale Anzahl 300 für 25 Individuen, 288 für 24 Individuen und 94 für die negative Kontrolle (17 Individuen) entstehen können. Es wurden jeweils alle Individuen 25:24:24:24:17 in den jeweiligen Gruppen zueinander betrachtet und davon die drei vermessenen Blätter.

In der Zeit unmittelbar nach dem Reiz trat keine Wuchsveränderung auf. Diese wäre vermutlich durch die elektrischen Signale induziert gewesen. Innerhalb der nächsten 4 Tage konnte eine Wuchsinduktion im jüngsten Blatt beobachtet werden, die der der positiven Kontrollpflanzen entsprach. Der Wuchs der trockengestressten Pflanzen stagnierte. Die Induktion kann nicht allein auf den Hitzestimulus zurückzuführen sein, da bei den gut bewässerten Hitzegereiztenpflanzen im Verhältnis zu den gleichzeitig stimulierten Pflanzen nur eine minimale Wuchsinduktion zu verzeichnen war. Eine verzögerte Wiederbewässerung der trockengestressten Pflanzen sorgte für eine verminderte Wuchsinduktion. Es traten jedoch bereits Welke-Erscheinungen der Blätter auf.

Die Auswertung des prozentualen Zuwachses, um ein Angleichen der Messergebnisse zu ermöglichen, ist leider gescheitert, da die Pflanzen zwar ein ähnliches Alter aufwiesen, aber der Entwicklungsstand so unterschiedlich war, dass das gemeinsame Betrachten von allen Individuen z. B. der Gruppe positive Kontrolle zu stark divergierende Ergebnisse lieferte. Die Pflanzen wurden nach Entwicklungsstand und Größe in Gruppen sortiert. Dies ermöglichte in der jeweiligen Gruppe zu vergleichen, welche Variante eine Induktion oder Hemmung verursachte.



Tabelle 4.4: Prozentuale Veränderungen der Behandlungen von *Zea mays*.

	positive Kontrolle	simultane Stimulation	Hitze stimulus	Wiederbewässerung	negative Kontrolle
Gesamtanzahl	25	24	24	24	17
<b>Induktion</b>					
Blatt 1	3	1 (-7,8 %)	4 (+4,7 %)	2 (-3,7 %)	1 (-6,1 %)
Blatt 2	1	7 (+25,2 %)	4 (+12,7 %)	4 (+12,7 %)	2 (+13,8 %)
Blatt 3	3	1 (-7,8 %)	4 (+4,7 %)	4 (+4,7 %)	3 (+5,7 %)
<b>Hemmung</b>					
Blatt 1	11	14 (+14,3 %)	13 (+10,2 %)	11 (+1,8 %)	10 (+14,8 %)
Blatt 2	8	6 (-7,0 %)	12 (+18,0 %)	12 (+18,0 %)	5 (-2,6 %)
Blatt 3	3	6 (+13,0 %)	7 (+17,2 %)	5 (+8,8 %)	5 (+17,4 %)

Es wurde, genauso wie bei *Glycine max L.*, der prozentuale Zuwachs von einem auf den anderen Messtag betrachtet, unter besonderer Berücksichtigung der Entwicklung nachdem der Reiz gesetzt wurde (Tab. 4.4). Eine Wuchsinduktion des jüngsten Blattes nach dem Reiz ergab sich in 3:1:4:2:1 der Fälle (positive Kontrolle: simultane Stimulation: Hitze stimulus: Wiederbewässerung: negative Kontrolle). Eine Wuchsinduktion des 2. Blattes nach dem Reiz ergab sich in 1:2:7:4:4 der Fälle (positive Kontrolle: negative Kontrolle: simultane Stimulation: Hitze stimulus: Wiederbewässerung). Eine Wuchsinduktion des 3. Blattes nach dem Reiz ergab sich bei 3:3:1:4:4 (positive Kontrolle: negative Kontrolle: simultane Stimulation: Hitze stimulus: Wiederbewässerung).

Als eindeutiges Ergebnis lässt sich daraus ableiten, dass der absolute Entzug von Wasser zu einer Wuchshemmung führte. Ebenso sorgte der kurzzeitige Wasserentzug bei dem 3. Blatt für eine teilweise verzögerte Wachstumsinduktion. Dies war zu beobachten, indem das 2. und 3. Blatt jeweils einen Tag versetzt zu der Wiederbewässerung reagierten. Der Hitze stimulus induzierte eine direkte Reaktion, die zur Hemmung führte.

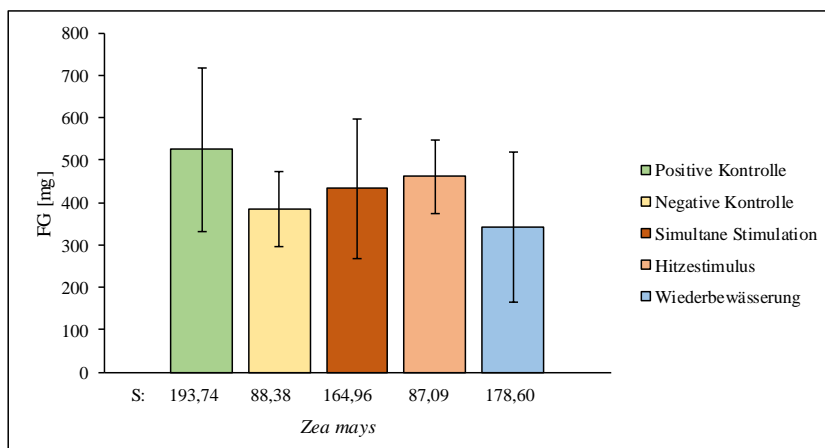
Die Blätter der wiederbewässerten und der zeitgleich Stimulation erfahrenden Individuen erlebten eine Hemmung im Wuchs. Der Hitze stimulus induzierte einen verstärkten Wuchs beim 2. und 3. Blatt gegenüber der positiven Kontrolle. Am stärksten wurde der Wuchs des 2. Blattes durch den simultanen Reiz von Wiederbewässerung und Hitze stimuliert. Allerdings hat sich als Maximum nur eine Induktion bei 7 von 24 Individuen ergeben, was ca. einer 29,2%igen Wahrscheinlichkeit entspricht. Für die Untersuchung der prozentualen Wuchshemmung wurden dieselben Messungen verwendet, wie für die der Wuchsinduktion, ebenso wurde hier jeweils die Entwicklung nach dem Reiztag betrachtet. Eine Wuchshemmung des jüngsten Blattes nach dem Reiz ergab sich in 11:10:14:13:11 der Fälle (positive Kontrolle: negative Kontrolle: simultane Stimulation: Hitze stimulus: Wiederbewässerung). Dabei muss berücksichtigt werden, dass die simultane Stimulation und der Hitze stimulus

eine Gewebeverletzung der Blattspitze durch den Feuerreiz erfahren haben, welche die Wuchshemmung erklärt. Die unter Trockenstress leidenden Pflanzen wurden nach mehreren Tagen ohne Wasserzufuhr wiederbewässert.

Eine Wuchshemmung des 2. Blattes nach dem Reiz ergab sich im Verhältnis 8:6:12:12:5 (positive Kontrolle: simultane Stimulation: Hitzestimulus: Wiederbewässerung: negative Kontrolle). Dies würde implizieren, dass sowohl nach dem Hitzestimulus als auch der Wiederbewässerung einzeln eine Wuchshemmung in 50 % der Fälle induziert wurde. Allerdings gab es ebenso bei 66,7 % der trockengestressten und hitzestimulierten Pflanzen keine Veränderung des prozentualen Wachses.

Eine Wuchshemmung des 3. Blattes nach dem Reiz ergab sich bei 3:6:7:5:5 (positive Kontrolle: simultane Stimulation: Hitzestimulus: Widerbewässerung: negative Kontrolle). Betrachtet man die Kontrolle nun wieder als Nullwert, sodass die Anzahl der gehemmten bzw. induzierten Individuen der positiven Kontrolle der natürlichen Varianz der *Zea mays* Pflanzen entsprechen.

Die Tabelle 4.4 zeigt eine bessere Wuchsinduktion des 2. Blattes bei gleichzeitiger Stimulation bei ~25 % der Individuen (auch eine geringere Hemmung) gegenüber den Kontrollen. Beim Hitzestimulus wurde in 12,7 % der Fälle induziert und in ~18 % gehemmt (3:4). Ebenso wird der Wuchs des 3. Blattes am häufigsten nach Hitzestimulus und der negativen Kontrolle (~17 %) gegenüber der positiven Kontrolle gehemmt. Bei Trockenstress wurde beinahe doppelt so häufig gehemmt wie induziert (8,8 % zu 4,7 %). Dem entgegen stehen die Ergebnisse der negativen Kontrolle, die eigentlich ein klares Bild von Wuchshemmung bei allen Blättern zeigen müssten. Diese wiesen teilweise öfter eine Induktion (2. und 3. Blatt) gegenüber der positiven Kontrolle auf, zeigten dennoch die häufigste Hemmung (1. und 3. Blatt). Ein entscheidender Faktor könnte dabei die starke Trockenstresstoleranz von *Zea mays* sein.



**Abbildung 4.30: Ernteparameter des Reizversuches von *Zea mays*.** Die Datenpunkte repräsentieren die Mittelwerte  $n=5 \pm$  Konfidenzniveau (95 %). Mit S ist der jeweilige Standardfehler dargestellt.

Bei der Betrachtung des Frischgewichtes von *Zea mays*, dargestellt in Abb. 4.30, hatte sich kein signifikanter Unterschied in den einzelnen Gruppen zueinander ergeben. Erkennbar ist dies an den sich überlagernden Konfidenzniveaus.

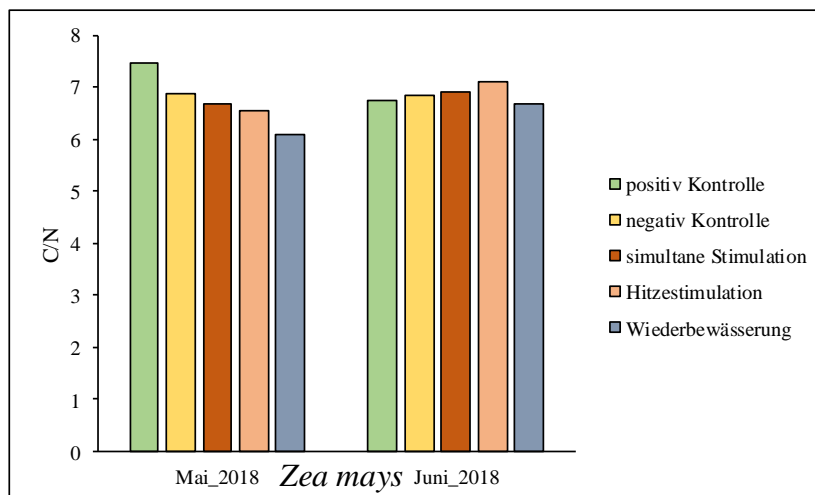
Im Folgenden sind die zuvor dargestellten Ergebnisse für die Wuchsveränderungen von *Zea mays* durch die verwendeten Reize kurz zusammengefasst:

- Gesamtzeitraum Blätterwachstum: Alle vermindert gegenüber der positiven Kontrolle, bei absoluten Trockenstress (negative Kontrolle) am stärksten
- Prozentuale Veränderung nach dem Reiz im Wachstum des 2. Blattes: Alle stärkerer Zuwachs gegenüber der positiven Kontrolle, simultane Stimulation stärkster Wuchs im 2. Blatt, Einzelreize stärkste Hemmung (Hitzestimulus und Wiederbewässerung)
- Prozentuale Veränderung nach dem Reiz im Wachstum des 3. Blattes: Zuwachs am stärksten bei Hitzestimulus und negative Kontrolle, simultane Stimulation schwächster Zuwachs
- Ernte: Keine signifikanten Unterschiede im Frischgewicht

#### 4.2.9.1 C/N Analyse von *Zea mays*

Obwohl es 5 Pflanzen je Behandlung und Ansatz gab, ist für die Elementaranalyse aufgrund der geringen Biomasse nur je eine Probe bei *Zea mays* entstanden. Insgesamt wurden zwei Durchläufe untersucht. In Abbildung 4.31 sind die Ergebnisse beider Versuchsdurchläufe

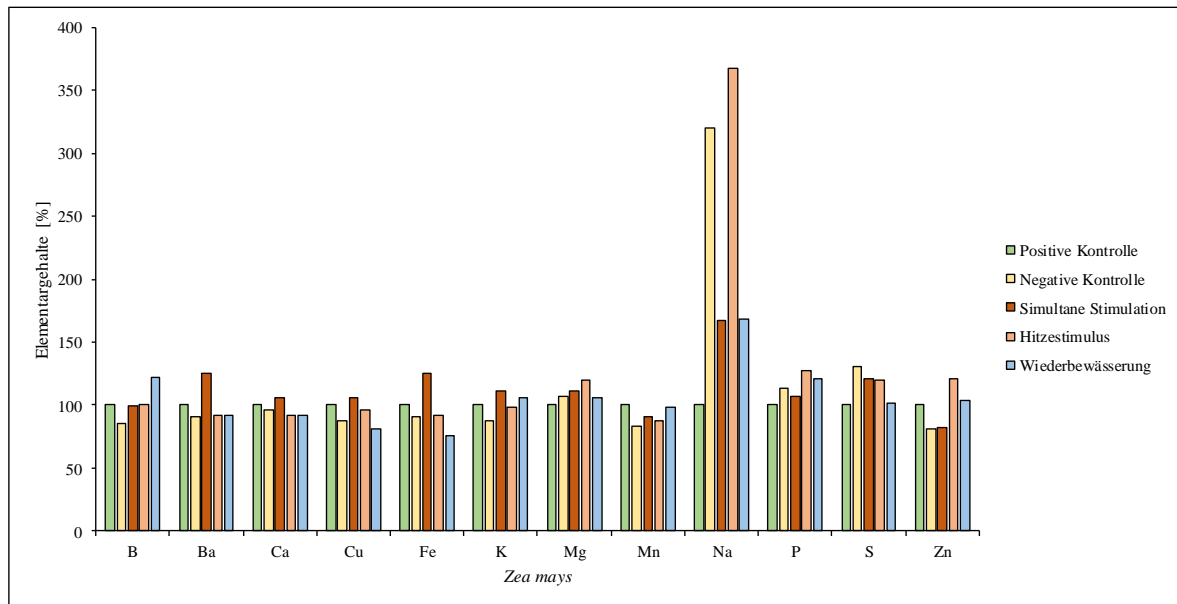
dargestellt. Es konnten keine signifikanten Unterschiede errechnet bzw. in den Konfidenzniveaus dargestellt werden, da wie zuvor beschrieben, jeweils nur eine Doppelmessung pro Behandlung möglich war.



**Abbildung 4.31: C/N Quotient von *Zea mays*.** Aus dem Stängel von 5 Pflanzen wurde eine Probe je Bedingung gewonnen.

#### 4.2.9.2 ICP-OES Analyse von *Zea mays*

Die unterschiedlichen Elementgehalte der optischer Emissionsspektrometrie von *Zea mays* sind in Abb. 4.32 dargestellt (Kapitel 3.2.12). Es wurde jeweils die positive Kontrolle als 100 % gesetzt und die anderen Bedingungen im Abhängigkeit dazu berechnet. Abweichungen von  $\pm 10$  % wurden vernachlässigt und werden im Folgenden nicht diskutiert.



**Abbildung 4.32: Elementgehalte der ICP-OES von *Zea mays* Pflanzen.** Aus einer Pflanze wurde eine Probe je Reiz gewonnen. Alkalimetall: K (Kalium) und Na (Natrium); Erdalkalimetall: Ba (Barium), Mg (Magnesium) und Ca (Calcium); Übergangsmetalle: Cu (Kupfer), Fe (Eisen), Mn (Mangan) und Zn (Zink); Halbmetall: B (Bor); Nicht Metalle: P (Phosphat) und S (Schwefel).

Es lässt sich die Tendenz erkennen, dass meist höhere Elementkonzentrationen gegenüber der positiven Kontrolle auftraten (Abb. 4.32).

Beim Borgehalt zeigten die Wiederbewässerung und die negative Kontrolle Unterschiede zur positiven Kontrolle. Dabei war bei den wiederbewässerten Individuen mehr Bor und bei der negativen Kontrolle weniger Bor zu finden. Eine Veränderung des Bariumgehaltes war nur bei der zeitgleichen Stimulation in Form einer 25%igen Erhöhung im Vergleich zur positiven Kontrolle zu messen. Der Calciumgehalt wurde nicht durch die verschiedenen Reize beeinflusst. Bei der Wiederbewässerung und der negativen Kontrolle war weniger Kupfer zu detektieren als bei der positiven Kontrolle. Auch der Eisengehalt war bei der Wiederbewässerung erniedrigt, allerdings zeigte die simultane Stimulation in diesem Zusammenhang eine Erhöhung. Bei Kalium und Magnesium trat eine Erhöhung um ca. 11 % jeweils bei der simultanen Stimulation im Vergleich zur positiven Kontrolle auf. Der Magnesiumanteil in den hitzestimulierten Pflanzen betrug 19 % mehr als bei der positiven Kontrolle. Die negative Kontrolle wies weniger Kalium auf. Bei der Mangankonzentration trat eine Verringerung bei der negativen Kontrolle und den hitzestimulierten Individuen auf. Der Natriumgehalt war bei allen anderen Varianten gegenüber der positiven Kontrolle erhöht, wobei diese Erhöhung bei der Wiederbewässerung und gleichzeitigen Stimulation

nur knappe 70 % betrug, aber bei der negativen Kontrolle und dem Hitzestimulus 220 % bzw. 260 %. Bei allen Gruppen mit Ausnahme der simultanen Stimulation lag eine erhöhte Phosphatkonzentration im Gewebe vor. Im Gegensatz dazu lag bei allen Varianten außer den wiederbewässerten Individuen eine erhöhte Schwefel- und Zinkkonzentration im Vergleich zur positiven Kontrolle vor.

# KAPITEL 5

---

## Diskussion

---

### 5.1 Rotationsversuch und der Einfluss der Thigmomorphogenese

Im Hinblick auf bereits bekannte Reize, die einen ähnlichen Effekt, wie die Rotation im pflanzlichen Gewebe induzieren, wurde die Thigmomorphogenese zu Rate gezogen und wird im Folgenden näher betrachtet. Jaffe untersuchte 1973 den von ihm so benannten Effekt der Thigmomorphogenese an unterschiedliche Pflanzenarten. Dafür wurde zweimal täglich der Stängel/Stamm der Pflanzen im Bereich der Internodien mittels seiner Finger 30-mal über einen Zeitraum von einer Woche gerieben. Er beobachtete dabei, dass die tägliche Reibung der Versuchspflanzen zu einer Wuchshemmung führte (Jaffe, 1973). Allerdings reagierten nicht alle von Jaffe untersuchten Arten, sodass keine Reaktion bei *Cucurbita pepo* (Gartenkürbis), *Pisum sativum* (Erbsen) und *Triticum aestivum* (Weichweizen) beobachtet werden konnte.

Die stimulierten *Mimosa pudica* zeigten eine 44%ige Wuchshemmung. Dies entspricht ca. der doppelten Wuchshemmung (22,3 %), die in dieser Arbeit bei *Mimosa* im Vergleich zur Kontrolle beobachtet wurde (s. Abb. 4.2 A), obwohl der Versuch über 9,5 Wochen ging. Dabei konnte Jaffe (1973) die Wuchshemmung erst zeitverzögert feststellen und signifikante Unterschiede in der Höhe konnten von ihm erst nach 15 Tagen gefunden werden (Jaffe, 1973). Im Gegensatz dazu wurden in der vorliegenden Arbeit Unterschiede gefunden, die bereits nach einer Woche signifikant waren.

Bei dem von Jaffe untersuchtem *Zea Mays* cv. Early belle wurde eine 28%ige Wuchshemmung induziert. Eine Wuchshemmung konnte ebenso beim hier durchgeführter Rotationsversuch gefunden werden, dabei war der Unterschied aber nur im Fall von einer Gruppe (*Zea* III) signifikant und lediglich halb so groß. Die beobachteten Hemmungen lagen zwischen 5,11 % (*Zea* I) bis zu 11,67 % (*Zea* III).

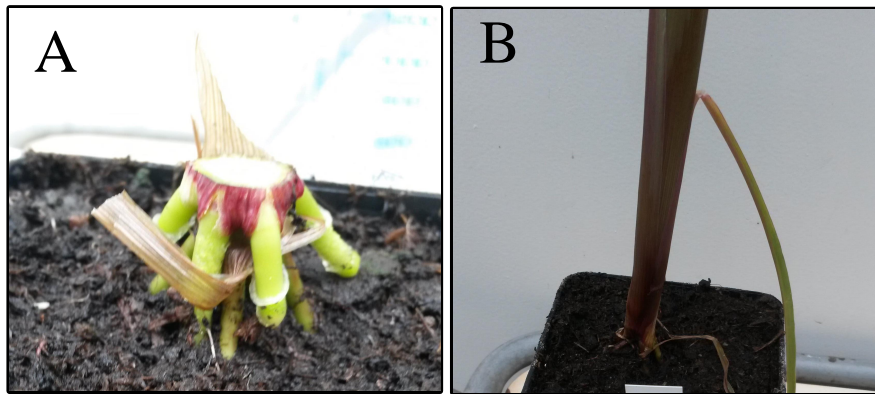
Die rotierten *Acer* Bäume zeigten hingegen eine Wuchshemmung von 30,6 % nach 6 Wochen.

Ein weiterer Aspekt ist die diurnale Rhythmik des Reizes. An *Lycopersicon esculentum* cv. Oh8245 (Tomaten) konnte ein diurnaler Rhythmus durch mechanische Stimulation mittels dem Streichen mit einem Pinsel gezeigt werden, sodass die Pflanzen morgens empfindlicher waren und mit vermindertem Wuchs reagierten im Gegensatz zu nachmittags, wo ein verstärkter Wuchs auftrat (Garner und Björkman, 1996). Dies unterstützt den hier gewählten zeitlichen Verlauf des Experiments, welches von 8 bis 18 Uhr täglich durchgeführt wurde, sodass im Durchschnitt ein veränderter Wuchs im Vergleich zur unbeeinflussten Kontrolle entstehen konnte.

Zusätzlich fand Jaffe (1973) an *Bryonia* (Zaunrüben) einen proportionalen Zusammenhang zwischen der Anzahl der Reize und der dadurch induzierten morphologischen Veränderung, d.h. je häufiger stimuliert wurde desto stärker war die Wuchshemmung (Jaffe, 1973). Ebenso verglichen Mitchell et al. (1975) an „Bonny Best“ Tomaten (*Solanum lycopersicum*) über 4 Wochen täglich einmaliges horizontales Schütteln (282 U/min) für 30 sec mit zweimaligen und konnten auch dort feststellen, dass die Häufigkeit des Reizes einen Einfluss auf die Stärke der Wuchshemmung hat (Mitchell et al., 1975).

Jaffe (1973) konnte trotz Zunahme des relativen Wurzelgewichtes und Induktion eines gedrunenen Wuchses keine Signifikanz in den Unterschieden finden. Dem gedrunenen Wuchses war die erhöhte Blattanzahl in 2 von 3 Fällen bei *Zea* entsprechend (Abb. 4.10 B). Gardiner et al. (2016) beschrieben die Entstehung von Wurzelansammlungen durch unter anderem die Rotation des Wurzel-/Bodensystems im Boden aufgrund des Windeinflusses (Gardiner et al., 2016). Dies hätte im vorliegenden Rotationsversuch eine Erhöhung der Wurzelmasse impliziert. Bei den durchgeführten Untersuchungen mit *Mimosa* war im Gegensatz dazu eine nicht signifikante Abnahme der Wurzelmasse von den rotierten Individuen zur Kontrolle zu beobachten gewesen (s. Abb. 4.1 A und 4.2 C). Bei den Untersuchungen der Wurzelmassen von *Zea* hatte sich in Korrelation zu den Beobachtungen von Jaffe (1973) leicht signifikant mehr Wurzelmasse als bei den Kontrollpflanzen gebildet. Eine Erklärung dafür könnte die durch die Rotation induzierte Ausbildung von Stützwurzel der rotierten Individuen im Vergleich zur Kontrolle sein (vgl. Abb. 5.1 A und B). Die Entstehung von Stützwurzeln ist ebenso bei der Aussaat auf freiem Feld möglich, allerdings laut des deutschen Maiskomitee e.V. (DKM) sortenspezifisch (<https://www.maiskomitee.de/Fakten/Züchtung/Morphologie> Stand: 28.01.2019, 18:06 Uhr). Die Stützwurzeln waren aufgrund des Entwicklungsstandes während des Rotationsversuches bei der Kontrollpflanzen noch nicht ausgebildet. Gleichfalls fand Darwin bereits 1881 bei der Untersuchung der Wurzeln von *Pisum sativum* (Erbsen) heraus, dass mechanische Stimulation für eine Erhöhung der Wurzelmasse und Veränderung der Richtung des Wurzelwachstums sorgte (Darwin, 1881).





**Abbildung 5.1: Stängel von *Zea Mays*.** (A) Rotierte *Zea* Individuum mit Stützwurzeln; (B) Kontrolle *Zea* ohne Stützwurzeln.

In dem Review von Braam (2005) wurde zusammenfassend als Reaktion auf die Thigmomorphogenese vieler unterschiedlicher Pflanzenarten eine Reduzierung des Höhenwachstums mit gleichzeitiger Zunahme des Durchmessers beschrieben (Braam, 2005). Dies spiegelt die hier vorliegenden Ergebnisse des Rotationsversuches wieder.

Zur Ursache für diesen Effekt wurde an der Modelnpflanze *Arabidopsis thaliana* Ökotyp Columbia-0 nach Stimulation der Rosettenblätter durch leichtes hin- und herbiegen von Lee et al. (2005) gefunden, dass innerhalb von 30 Minuten über 2,5 % aller Gene hochreguliert werden, was im Detail 589 Gene mit berührungsinduzierter Expression entspricht (Lee et al., 2005). Im Gegensatz dazu wird die Expression von nur 171 Genen reduziert (Lee et al., 2005).

In den 1970er Jahren wurden erste Versuche zu einer phytohormonabhängigen Veränderung des Habitus durchgeführt. Von Jaffe wurde aus dem Zusammenhang, dass Auxin die Ethylenproduktion in mehreren Pflanzen und Geweben induziert und das Ethylen gleichzeitig die Streckung verhindert (Burg und Burg, 1966) eine Ethylenabhängigkeit der Thigmomorphogenese abgeleitet (Jaffe, 1973). Dagegen wird Auxin und dessen Gradient von der Wurzel bis zum Apikalmeristem für die Elongation des Sprosses verantwortlich gemacht (Sachs, 1991). Sorce et al. (2013) widersprechen dem auf Grundlage von Daten von 2007, indem der radiale Wuchs ihrer Meinung nach wesentlich mehr Bedeutung als die Elongation durch Auxin hat (Sorce et al., 2013). Da sie eine positive Korrelation des radialen Zuwachs bedingt durch die Konzentration der Indol-3-Essigsäure (Auxin) im Xylem von hybrid Wurzelstöcken bei Pfirsich mit darauf gepfropften Pfirsich fanden (Sorce et al., 2007). Allerdings wurden diese Überlegungen 1998 von Johnson und Ecker verworfen, da sie Ethylen nicht als erforderlich für die morphologischen Veränderungen einhergehend mit der Berührung sahen (Johnson und Ecker, 1998).

Ebenso maßen Chehab et al. (2012) dem Ethylen keine so große Bedeutung bei, sondern

sahen Jasmonat als ausschlaggebend für die Thigmomorphogenese. Ihre Untersuchungen führten sie an *Arabidopsis thaliana* durch. Dabei wurde über entsprechende Mutanten, die kein Jasmonat bilden konnten, herausgefunden, dass dieses als Reaktion auf einen einzelnen Berührungszustand zunimmt und als Konsequenz nach wiederholter Reizung akkumuliert. Hierbei steht die Menge des akkumulierten Jasmonats mit der Stärke der durch Berührung induzierten morphologischen Veränderung im Zusammenhang (Chehab et al., 2012). Dies wäre eine auf Phytohormonen beruhende Erklärung für die zuvor bereits erwähnte Reizintensität in Zusammenhang mit der Wuchsveränderung (Jaffe, 1973; Mitchell et al., 1975). Zusätzlich beschrieben Scherzer et al. (2017) als Reiz auf Berührung, dass die Drüsenzellen in der Venusfliegenfalle, in denen durch gefangene Insekten berührungsinduzierte Aktionspotenziale ausgelöst werden, diese in Jasmonat Signale übersetzen (Scherzer et al., 2017). Allerdings sind die Mechanismen der Akkumulation unbekannt und die berührungsinduzierte Genexpression trat bei fehlendem Jasmonat auf, was wiederum darauf hinweist, dass es Jasmonat-unabhängige Mechanismen geben muss, um die Transkription bzw. Translation des Berührungssignals in die Genexpression zu gewährleisten (Chehab et al., 2012). Letztendlich schlussfolgern Chehab et al. (2012) „thigmomorphogenesis is not a passive consequence of mechanostimulus-induced damage but is instead an active, JA-regulated response.“ Die Hauptaufgabe des Jasmonats ist nach allgemeiner Meinung die Schädlingsabwehr. So wurde von Cipollini (1997) bei der Untersuchung von Bohnen gefunden, dass windinduzierte mechanische Stimulation die Resistenz durch die Induktion des Lignin-Zweigs des Phenylpropanoid-Weges in Blättern gegenüber Schädlingen erhöht (Cipollini, 1997). Dies deutet daraufhin, dass die Thigmomorphogenese nicht nur strukturell widerstandsfähiger macht, sondern zeitgleich für eine Resistenz gegenüber Pathogenen sorgt.

Obwohl die oben genannten Ergebnisse eindeutig auf einen Zusammenhang der Reizung mit dem Phytohormonhaushalt bei Pflanzen und sogar der Schädlingsabwehr hinweisen, konnten nur vereinzelt Veränderungen auf zellulärer Ebene gefunden werden. Laut Gardiner et al. (2016) soll sich bei nicht-verholzenden Pflanzen auf zellulärer Ebene unter dem Einfluss von Wind mehr Festigungsgewebe bilden, wie zum Beispiel eine Lignifizierung oder Sklerenchym. Bei verholzenden Arten sollte sich eine Reduzierung der Länge und Durchmesser der Gefäße ergeben haben (Gardiner et al., 2016). Dies konnte durch die Ergebnisse der beiden verholzenden Arten *Mimosa* und *Acer* nicht eindeutig bestätigt werden. Bei *Acer* hatte sich eine signifikant geringere Gefäßdichte gebildet (Abb. 4.9). Bei *Mimosa* waren keine Unterschiede zu beobachten gewesen (Abb. 4.3). Laut Aloni (1987) ist es entscheidend, bei vergleichenden anatomischen Studien auf den Abstand der einzelnen untersuchten Holzproben zu den jungen Blättern zu achten, da die Größe und das Muster der Gefäße sowie Fasern in den verholzenden Geweben innerhalb derselben Pflanze

variieren (Aloni, 1987). Deshalb wurde penibel darauf geachtet, dass die Querschnitte von der Basis aus gewonnen wurden, um verfälschende Ergebnisse durch die Orientierung der Probe zu verhindern.

Allerdings ist die Thigmomorphogenese nicht deckungsgleich mit dem verwendeten Stimulus der Rotation, da es sich bei der Thigmomorphogenese um einen berührungsinduzierten Reiz handelt (s. Einleitung Kapitel 2.9). Durch die Rotation war es möglich, dass sich die Pflanzen berührten, aber dieser Zustand war nicht permanent gegeben. Die Berührung und der Wuchs auf einer Fläche von 1.276 cm<sup>2</sup> hatte eine eventuelle gegenseitige Beschattung bei den untersuchten Pflanzen zur Folge. Allerdings wurde 2007 von Liu et al. an Pflanzen mit Ausläufern keine unterdrückende Wirkung der Thigmomorphogenese durch die Beschattung gefunden. Im Gegensatz dazu induziert Beschattung ohne den Berührungsreiz den Blattstielwuchs zur Lichtquelle (Liu et al., 2007).

Somit sind die gewonnenen Erkenntnisse der Thigmomorphogenese zwar als Anhaltspunkte für beobachtete Reaktionen auf die Rotation zu verwenden, können aber nicht gänzlich übertragen werden. Eine durch Schütteln oder Rotation veränderte Morphologie wurde von Sarmast et al. (2014) als Seismomorphogenese bezeichnet, wobei die Autoren diesen Begriff Jaffe (1973) zuschreiben (Sarmast et al., 2014). Bereits 1975 wurde von Seismomorphismus gesprochen (Mitchell et al., 1975). In diesem Zusammenhang wurde von Mitchell (1992) an *Solanum tuberosum* L. (Kartoffelpflanzen) gezeigt, dass sowohl das Streicheln der Stielspitzen (berührungsinduzierter Stress) als auch das Schütteln des gesamten Triebes (seismischer Stress) zu einer Reduktion der Größe und Biomasse führten (Mitchell, 1992). Dies würde implizieren, dass ein Vergleich zwischen der Thigmomorphogenese mit der Seismomorphogenese möglich ist.

Zusätzlich soll die Verschiebung des C/N Quotienten durch die Rotation betrachtet werden. Im Bezug auf den C/N Quotienten lag bei den Blättern der *Mimosa pudica* der Stickstoffgehalt im Durchschnitt bei 2,36 % und der Kohlenstoffgehalt bei 42,55 %. Insgesamt sorgte die Rotation für einen geringeren Stickstoffgehalt in den untersuchten Geweben. Mattson fasste 1980 zusammen, dass unter zunehmender Belastung durch den Feuchtigkeitsstress der Stickstoffgehalt steigt (Mattson, 1980). Allerdings konnte von Dina und Klikoff (1973) an *Artemisia tridentata* (Wüsten-Beifuß) gezeigt werden, dass dieser Anstieg partiell in Geweben geschehen kann, sodass unter Wasserstress eine Abnahme des Stickstoffgehaltes in den Blättern zu beobachten war, aber ein Anstieg im Stamm (Diana und Klikoff, 1973). Dies widerspricht den bei *Mimosa* gefundenen Ergebnissen, bei denen in beiden untersuchten Gewebearten (Wurzel und Stamm mit Blättern) ein verminderte N-Gehalt zu finden war.

Die im Rotationsversuch beobachtete Reizadaption bei *Mimosa pudica* soll im Folgenden

an Hand erschienener Veröffentlichungen näher betrachtet und eingeordnet werden. Eine Reizadaption nach der Behandlung mit Rotation wurde von Gagliano et al. (2014) beobachtet und publiziert. Dabei wurden zwei unterschiedliche Stimuli verwendet. Zum einen der Sturz aus 15 cm Höhe und das Schütteln bei 250 rpm (Gagliano et al., 2014). Eine Reizadaption konnte ebenso beim Fallen beobachtet werden. Dennoch war die Reizwahrnehmung eines bis dahin für die Pflanzen „unbekannten“ Reizes (Schütteln) unbeeinflusst. Im Jahr 2000 wurden Ergebnisse zur Speicherbarkeit von Information im pflanzlichen Gewebe veröffentlicht (Thellier et al., 2000). An *Bidens pilosa* L. (behaartem Zweizahn) wurde das Apikalmeristem (Knospe) entfernt. Die Setzlinge verfügten über 2 Keimblätter und 2 Knospen. Die Entfernung induzierte einen symmetrischen Wuchs der Cotyledonen. Durch 4-maliges stechen eines Keimblattes mit einer stumpfen Glasnadel konnte eine Asymmetrie im Wuchs induziert werden. Wenn erst gestochen und dann 2 Tage bis maximal 14 Tage später das apikale Meristem entfernt wurde, trat trotzdem der asymmetrische Wuchs in den Cotyledonen auf. Daraus wurde abgeleitet, dass die Information bis zu 2 Wochen erhalten bleibt. Auch nach Entfernung der Cotyledonen wurde derselbe Effekt beobachtet, sodass die Autoren daraus schlossen, dass die Information im Gewebe gespeichert sein muss und nicht aus dem geschädigten Gewebe abgerufen wird (Thellier et al., 2000). Ein Tropfen eines Gewebeextraktes von stimulierten Cotyledonen induzierte in unbehandelten Setzlingen das gleiche Ergebnis. Letztendlich schlussfolgerten Thellier et al. (2000), dass das symmetriebrechende Signal eine differentielle Aktivierung oder Biosynthese von mitosefördernden Faktoren innerhalb der Keimblattknospen bewirkt. Durch das Bearbeiten des Keimblattes mit der stumpfen Glasnadel wurden elektrische Signale im Gewebe induziert, deren Ausbreitung in direktem Zusammenhang mit dem Symmetrie abschaltenden Signal stehen (Desbiez et al., 1992). Pickard wies 1972 mithilfe von extrazellulären Elektroden nach, dass sowohl *Ipomoea* (Prunkwinden), *Pisum* (Erbsen) als auch *Xanthium* (Spitzenkletten) beim Wuchs des Sprosses spontane Potenziale unabhängig der Lichtbedingungen generieren (Pickard, 1972). Zusätzlich zeigte Pickard (1971) an *Pisum sativum* L. cv. Alaska (Erbsen), dass unsynchrone Aktionspotenziale geringer Amplitude (ca. 2,5 mV) der mechanischen Stimulation von Stammgewebe folgen. Allerdings sah Pickard diese Aktionspotenziale als keine direkte Folge der Stimulation bedingt durch den zeitlichen Verlauf, da diese zum einen zeitverzögert zum Reiz und zum anderen bis zu mehreren Stunden danach zu beobachten waren (Pickard, 1971). Fromm (1991) schlussfolgerte aus seinen Beobachtungen an *Mimosa pudica*, dass das Aktionspotenzial bei der Phloementladung von Saccharose in den Pulvini eine Rolle spielt. Dies steht im Zusammenhang mit der Abnahme im Turgordruck der Pulvini-Motor-Zellen nach Berührung, ausgelöst durch ein Aktionspotenzial (Fromm, 1991). Beim hier durchgeführten Rotationsversuch konnten elektrische Signale im Blattgewebe während der Rotation von 25 mV bis zu 40 mV gemessen werden (s. Abb. 4.14).

Eine Erläuterung der berechneten Signifikanzen soll deren Verlässlichkeit validieren. Letztendlich muss für die Daten des Rotationsversuches, bei denen die Streuung der einzelnen Individuen mit dem Konfidenzniveau von 95 % dargestellt wurde (bspw. Abb. 4.8), im Gegensatz zu den berechneten t-Test Ergebnissen der geringe Stichprobenumfang berücksichtigt werden. Auf Grundlage des Konfidenzniveaus erscheint es so als wären die mithilfe des t-Tests berechneten Unterschiede zwischen den rotierten und Kontroll-Proben nicht signifikant. Wie zuvor beschrieben, sorgt der geringe Stichprobenumfang für einen großen Standardfehler. Schon Sedlmeier definierte 1996 den Signifikanztest als eine Multiplikation aus der Effektgröße und dem Stichprobenumfang. Er umschrieb, dass keine Signifikanz im Umkehrschluss nicht sagt, dass es wirklich keine Abhängigkeit gibt (Sedlmeier, 1996). Hoem sieht 2008 die Bedeutung von Ergebnissen für die Wissenschaftsgemeinschaft als ausschlaggebend gegenüber der Berechnung von Signifikanzen. Er schlägt vor, höhere p-Werten für einen geringeren Stichprobenumfang zu erlauben (Hoem, 2008). Deshalb wurden sowohl das Konfidenzniveau als auch die Ergebnisse des ungepaarten Students t-Test abgebildet.

## 5.2 Mehrfache Stimulation und Einflussfaktoren

### 5.2.1 THz-Transmissionsmessungen der absoluten Wassermenge in Blättern

Auf Grundlage der etablierten Methode von Koch et al. (2001), die den Wassergehaltsanstieg im Blattgewebe nach Wiederbewässerung gezeigt hatten (Koch et al., 2001) und mit Unterstützung von Herrn Gente wurde der Versuch zur simultanen Stimulation durchgeführt. Dieser war die Basis für die im 2. Teil der Arbeit durchgeführten Untersuchungen zur mehrfachen Verarbeitung von Reizen im pflanzlichen Gewebe von Nutzpflanzen. Im Jahr 2016 veröffentlichte Gente im Rahmen seiner Dissertationsschrift die Untersuchung und Beobachtung des Wasserstatus verschiedener Nutzpflanzen (Gente, 2016). Der Zeitpunkt der Wiederbewässerung wurde auf Grundlage von Erfahrungswerten bezüglich der Welkepunkte ermittelt. Bedingt durch die Trockenstresstoleranz der Maispflanzen konnte Gente (2016) beobachten, dass sich nach der Wiederbewässerung der Zustand der Blätter in drei Status unterscheiden ließ. Zunächst einen Status bei dem der permanenten Welkepunkt bereits überschritten war oder als zweiten bei dem dieser noch nicht erreicht wurde, wodurch es zu einer vollständigen Erholung kam. Als letzten einen, der durch eine kurzzeitige Erholung vor dem Absterben des Blattes geprägt war. An Sojapflanzen konnte entweder die Überschreitung des Welkepunktes oder den Verbleib in vitalen Bedingungen beobachten werden (Gente, 2016).

An *Glycine max L.* war durch den zeitversetzten Feuerreiz nach der Wiederbewässerung ein kurzzeitiger Rückgang der Transmissionmessung zu beobachten (Abb. 4.15). Dies spricht für eine temporäre stärkere Wasseraufnahme, an die eine Wasserabgabe sich anschloss. Allerdings könnte die Änderung auch auf Messschwankungen zurückgehen, da sie die Grenze von mehreren Prozent nicht überschritten hatte. Da die Transmissionswerte sanken und somit der Wassergehalt im Blattgewebe stieg, kann davon ausgegangen werden, dass der permanente Welkepunkt noch nicht überschritten war. Besonders in Anbetracht der Tatsache, dass Gente (2016) an Soja keine kurzzeitige Erholung der Blattflächen feststellen konnte (Gente, 2016). Weitere Wiederholungen wären für eine Verifizierung der Ergebnisse der kurzzeitigen Beeinflussung der Wasseraufnahme im Blattgewebe durch den Feuerstimulus notwendig gewesen, waren aber wegen eines zeitlich begrenzten Forschungsaufenthaltes in Marburg nicht möglich.

### 5.2.2 Hitzestimulus und seine Auswirkungen

Um einen Vergleich für die simultane Stimulation zu haben, werden ebenso die einzelnen Stimuli betrachtet und im Folgenden diskutiert. Bei der Gegenüberstellung der gewonnenen Ergebnisse mit dem Forschungsstand konnte von Koziolk et al. (2003) im Bezug auf den Hitzestimulus auf Grundlage ihrer Beobachtungen an *Mimosa pudica* ausgeschlossen werden, dass die Reduzierung der Photosynthese nach Stimulation mit Hitze auf ein chemisches Signal zurückzuführen ist. Vielmehr sahen sie elektrische Signale als ausschlaggebend (Koziolk et al., 2003). Nach dem Hitzestimulus an *Zea mays* kam es zu einem kurzzeitigen Anstieg der Photosynthese, stomatären Leitfähigkeit und Transpiration, nachdem ein Zurückgang der Parameter folgte. Erst nach ca. 40 Minuten begannen die Werte sich zu erholen (Abb. 4.17 A.I und A.II).

Der Anstieg der stomatären Leitfähigkeit ist auf hydropassive Stomatabewegungen zurückzuführen, die durch den plötzlichen Verlust des epidermalen Turgors verursacht werden, während die Verringerung der Netto CO<sub>2</sub> Aufnahme zumindest teilweise auf eine Störung der Lichtreaktionen bei Photosystem I und II zurückzuführen ist (Koziolk et al., 2003). In den für diese Dissertationsschrift durchgeführten Versuchen wurden sowohl elektrische Signale durch den Feuerreiz induziert und nachgewiesen (z. B. Abb. 4.18 B), als auch der Rückgang der Photosynthese, stomatären Leitfähigkeit und Transpiration (Abb. 4.16 A/4.17 A) bei beiden untersuchten Arten (*Glycine max L.* und *Zea mays*) festgestellt.

Von Favre et al. (1999) konnten sogar an *Conocephalum conicum* (Kegelkopfmoss) einzelne durch Hitze oder Kälteschocks ausgelöste Aktionspotenziale beobachtet werden. Durch Verwundung entstanden hingegen mehrere Aktionspotenziale (Favre et al., 1999).

Auch bei *Mimosa pudica* gibt es einen Zusammenhang zwischen einem Hitzestimulus und Photosyntheseprozessen. Allerdings waren die Photosynthese und stomatäre Leitfähigkeit



sowohl im Licht als auch in der Dunkelheit in der Studie von 2013 gegenläufig im Gegensatz zu den hier gewonnenen Erkenntnissen. Unter Licht nahm die Photosynthese ab und die stomatäre Leitfähigkeit zu. In Dunkelheit war die Photosynthese negativ und bei der stomatären Leitfähigkeit konnte ein stärkerer Anstieg beobachtet werden (Lautner et al., 2013).

Von Gallé et al. (2013) wurde eine Erklärung für den Rückgang der Photosynthese (um ca. 40 %) nach dem Hitzestimulus an *Glycine max L.* geliefert. Die Autoren zeigten, dass die Leitfähigkeit für die CO<sub>2</sub>-Diffusion im Mesophyll mit >60 % durch das elektrische Signal des Reizes zurückging. Im Gegensatz dazu wurde die Elektronentransportrate der Photosynthese wesentlich schwächer beeinflusst (ca. 15 %) (Gallé et al., 2013). Gallé et al. (2013) schlussfolgerten aus der Verschiebung von K, Mg, O und P im Blattchloroplasten, dass die starke Reduzierung der chloroplastischen CO<sub>2</sub>-Konzentration bedingt durch eine Veränderung des Mesophyllmembranpotenzials und Änderung der intrinsischen Diffusionswege als limitierende Faktoren für Photosynthese durch das hitzeinduzierte elektrische Signal dienen, trotz der zuvor hydropassiven Öffnung der Stomata als Reaktion auf die Verbrennung (Gallé et al., 2013).

Diese Erklärung entspricht den hier gewonnenen Gaswechsellmessungen, da bei einer Abnahme der Leitfähigkeit im Mesophyll ein Anstieg der interzellulären CO<sub>2</sub>-Konzentration zu finden ist. Wie in Abb. 4.16 (I und II) dargestellt, verlief die interzelluläre CO<sub>2</sub>-Konzentration bei *Glycine max L.* immer genau gegenläufig zu den anderen Parametern (Netto CO<sub>2</sub> Aufnahme, stomatäre Leitfähigkeit und Transpiration).

Davies (2004) sah den Einfluss von Hitzereizen nicht nur in oberirdischen Pflanzenteilen, sondern ebenso in Prozessen wie der Genexpression oder dem Stoffwechsel (Davies, 2004). Grams et al. (2009) bestimmten an *Zea mays* für Hitze induzierte elektrische Signale die Ausbreitungsgeschwindigkeit mit 3 – 5 mm s<sup>-1</sup>, ebenso nahm die Netto CO<sub>2</sub> Aufnahme und die photochemische Quantenausbeute beider Photosysteme (I und II) ab (Grams et al., 2009). Bei den Versuchen wurde eine um den Faktor 10 geringere photosynthetisch aktive Radiation im Vergleich zu den hier durchgeführten Versuchen verwendet (100 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> zu 1000 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>). Die vorübergehende Abnahme der Photosynthese breitete sich basipetal im gesamten Blatt aus und erreichte nach ca. 2,5 Minuten ihr Minimum (Grams et al., 2009). Während die Netto CO<sub>2</sub> Aufnahme zurückging, stieg die stomatäre Leitfähigkeit zunächst rasch bis zum Maximum nach über 3 Minuten an. Im vorliegenden Versuch war ebenso an *Zea mays* die stomatäre Leitfähigkeit und die Photosynthese gegenläufig und zusätzlich das dabei entstandene elektrische Signal wesentlich schneller mit einer Geschwindigkeit von 1,25 cm s<sup>-1</sup> (Abb. 4.17 I und II).

Laut Herde et al. (1999) induziert Hitze die gleichen Ergebnisse wie mechanische Verwundung und ähnliche Prozesse, die durch Lichtstress auftreten, wie charakteristische

Veränderungen in der Pigmentzusammensetzung des Xanthophyll Zykluses. An *Lycopersicon esculentum* Mill. cv. *Moneymaker* (Tomaten) konnte gezeigt werden, dass die nicht-photochemische Löschung sowie die Tiefenoxidation von Violaxanthin zu Zeaxanthin zunimmt und Abscisinsäure in den Blättern akkumuliert (Herde et al., 1999).

Im Hinblick auf die Signalweiterleitung des Hitzereizes und der Verwundung wurden verschiedene Studien herangezogen. Wildon et al. (1992) untersuchten Wundreaktionen an Tomatenpflanzen, die wie bei anderen Pflanzenarten die Proteinbiosynthese von Proteinase-Inhibitor-Genen auslösen (Wildon et al., 1992). Sie wollten testen, ob ein chemisches oder elektrisches Signal für die Verknüpfung aus lokalem Wundreiz und Signalweiterleitung verantwortlich ist. Ein chemisches Signal hätte über das Xylem transportiert werden müssen und setzte somit eine Umkehr des Transpirationssoges voraus, diese war nicht messbar. Letztendlich kam nur ein hydraulisches Signal mit sekundären elektrischen Folgen oder ein sich ausbreitendes Aktionspotenzial infrage (Wildon et al., 1992). Wildon et al. (1992) schlussfolgerten, dass ein Aktionspotenzial der Aktivator sein muss. Ebenso wurde von Davies (2004) beschrieben, dass elektrische Signale schneller sind als chemische (Davies, 2004). Salvador-Recatalà et al. (2014) untersuchten die Änderungen des Membranpotentials durch Fraßverletzungen von Raupen an *Arabidopsis thaliana* (Arabidopsis) Siebröhren mittels der Blattlaustechnik. Der Fraß induzierte Depolarisationswellen, die ihr Maximum nach 2 Sekunden mit ca. 60 mV erreicht hatten. Die Signalweiterleitung der verletzten Mittelrippe der *Lamina* (Blattspeite) generierte schnelle sowie langsame Depolarisationswellen in intakten benachbarten Blättern und zusätzlich langsame Depolarisationswellen (30 mV) in entfernten Blättern. Schnelle Depolarisationswellen in den Siebröhren sorgten für die Expression eines Jasmonat Genes. Allerdings fanden die Autoren keinen Zusammenhang zu der wundinduzierten langsamen Depolarisationswelle in den Siebröhren und schlossen daher eine Relevanz bei der Aktivierung der Jasmonat Synthese aus (Salvador-Recatalà et al., 2009).

Hlavackova et al. zeigten 2006 an *Nicotiana tabacum* cv. *Samsun* (Tabak), dass die Phytohormone Jasmonat und Abscisinsäure an der bereits nach 5 – 7 Minuten einsetzenden Hemmung der Photosyntheserate und der stomatären Leitfähigkeit in entfernten, unbeschädigten Tabakblättern nach einem Hitzestimulus mitwirken. Dabei sehen sie einen Zusammenhang zwischen der erhöhten Abscisinsäure Konzentration und dem Schließen der Stomata sowie der sich nach 15 Minuten anschließender systemischen Akkumulation von Jasmonat (Hlavackova et al., 2006). Diese Ergebnisse stützen die Schlussfolgerung, dass ein Hitzestimulus eine der Verwundung vergleichbare Antwort induziert, da Jasmonat auch an der Abwehr von Schädlingen nach Fraß beteiligt ist. Ähnlich verhält es sich mit dem veränderten Wuchs nach mechanischer Stimulation, die im Kapitel 5.1 beschrieben wurde, für den Jasmonat ebenfalls bedingt verantwortlich gemacht wird.

Von Lautner et al. (2005) wurden *Populus trichocarpa* sowie *Populus tremula* x *P. tre-*



*muloides* (Pappel) Stämme mit Hitze stimuliert. Es wurden sowohl basipetale Aktionspotenziale, die zu einer schnellen Membranhyperpolarisierung führten, durch den  $K^+$ -Efflux in der Blattlamina, als auch akropetale Variationspotenziale, die eine Depolarisation des Membranpotentials im Blattphloem auslösten, beobachtet. Beide Signale sorgen für eine verminderte Quantenausbeute der Elektronentransportkette des Photosystem II. Pappeln, die unter Calciummangel litten, reagierten durch ein schwächeres elektrisches Signal und eine fehlende Reaktion des Gaswechsels auf den Hitzestimulus. Daraus schlossen die Autoren, dass Calcium und Kalium entscheidend für die Signalübertragung im Phloem sind (Lautner et al., 2005).

Stankovic et al. (1998) zeigten an *Helianthus annuus L.* (Sonnenblume) durch Stimulation des Stängels, dass an dieser nur Aktionspotenziale generiert werden konnten, aber keine Variationspotenziale. Wurde ein Blatt mittels Hitze gereizt, entstand immer ein Variationspotenzial. Dabei ging dem Hitzestimulus am Stängel ein hydraulisches Signal voraus (Stankovic et al., 1998).

Insgesamt ist der einzelne Hitzereiz ein am und im pflanzlichen Gewebe gut untersuchter Reiz, dessen Ergebnisse reproduziert werden konnten und als Vergleich für die Kombination beider Stimuli diente. Auf die Analyse von beteiligten Phytohormonen wurde dabei verzichtet.

### 5.2.3 Wiederbewässerung nach Trockenstress und dessen Folgen

2007 wurde von Grams et al. gezeigt, dass die Wiederbewässerung nach Trockenstress in *Zea mays* durch die elektrischen Signale einen Einfluss auf die stomatäre Leitfähigkeit und die Photosynthese hatten. Es wurde dabei sowohl ein hydraulisches als auch elektrisches Signal ausgelöst. Zunächst beobachteten die Autoren einen Einbruch der beiden Parameter (Phase 1), der durch einen Anstieg abgelöst wurde (Phase 2), welcher über dem Ausgangsniveau der trockengestressten Pflanzen lag. Die Unabhängigkeit der beiden Signaltypen mit Antwort in zwei Phasen konnte durch Unterdrückung mittels kompensatorischen Druck auf das Wurzelsystem für das hydraulische Signal oder dem Abkühlen des Blattes für das Aktionspotenzial bestätigt werden (Grams et al., 2007).

In der vorliegenden Dissertationsschrift konnte diese zweiphasige Antwort an *Zea mays* repliziert werden (Abb. 4.17 B.I und B.II). Dabei begann Phase 2 nach 30 Minuten vom Reiz aus betrachtet. Im Gegensatz dazu entfiel bei *Glycine max L.* die erste Phase und es kam nur zu einem Anstieg der Parameter nach 10 Minuten (Abb. 4.16).

Gallé et al. (2015) zeigten an *Vitis vinifera* (Weinrebe), dass Distanzen von bis zu 150 cm nach Wiederbewässerung mit einer Geschwindigkeit von  $2,1 \text{ cm s}^{-1}$  überbrückt werden können (Gallé et al., 2015). An *Zea mays* wurde eine Geschwindigkeit von  $3,6 \text{ cm s}^{-1}$  (Abb.

3.20) bei einem Abstand von  $112 \text{ cm} \pm 8 \text{ cm}$  gemessen. An reifen Maisblättern wurden Elektro- und Kälteschock untersucht, wobei die Geschwindigkeit der Reizweiterleitung  $3 - 5 \text{ cm s}^{-1}$  betrug (Fromm und Bauer, 1994).

Im Phloem von Mais wurden elektrische Potenziale während des Kälteschocks (Aktionspotenzial) und der Verwundung (Variationspotenzial) gemessen. Das Variationspotenzial hatte im Gegensatz zum Aktionspotenzial einen Einfluss auf den Gaswechsel (Fromm et al., 2013).

Die von Fromm et al. (2013) beschriebenen Ergebnisse verhalten sich analog zu den hier durchgeführten Gaswechsellmessungen nach Wiederbewässerung von *Glycine max L.*, bei denen sich ein geringer Einfluss ergeben hatte (Aktionspotenzial). Gegensätzlich dazu verhält sich, dass durch die Wiederbewässerung in *Zea mays* ausgelöste elektrische Signale in Kombination mit dem hydraulischen Signal, welches einen starken Einfluss auf den Gaswechsel gezeigt hatten. Allerdings muss berücksichtigt werden, dass die Wiederbewässerung und der Kälteschock zwei unterschiedliche Stimuli sind, die zwar beide ein Aktionspotenzial induzieren, aber wie von Vodeneev et al. (2016) beschrieben, kann die Pflanze zwischen verschiedenen Stimuli unterscheiden und eine angepasste Antwort induzieren (Vodeneev et al., 2016).

Tardieu et al. (1991) ließen Mais teilweise in verdichteten Boden auf freien Feld wachsen, um den Einfluss der Bodenbeschaffenheit auf das Wasserpotenzial zu untersuchen (Tardieu et al., 1991). Durch die Verfestigung des Bodens war ein Einfluss auf die stomatäre Leitfähigkeit zu beobachten, der sich allerdings unter erhöhtem Bodenwasserpotenzial verflüchtigte. Dennoch waren die Unterschiede im Blattwasserpotenzial nicht auf die verschiedenen Leitfähigkeiten zwischen der Verdichtung des Bodens zurückzuführen, da das Wasserpotenzial des Bodens und in der Wurzelumgebung ähnlich war. Die Autoren interpretierten daraus, dass die stomatäre Leitfähigkeit durch das Wurzelwasserpotenzial über ein chemisches Signal der Abscisinsäure kontrolliert wird, da sie als Auslöser das Blattwasserpotenzial oder die mechanische Belastung auf die Wurzeln als unwahrscheinlich empfanden. Somit werden die Veränderungen der Stomata durch chemische Signale, die in den Wurzeln erzeugt werden, auch unter Feldbedingungen induziert. Im Gegensatz dazu konnte keine Induktion von Wurzelsignalen als Reaktion auf die mechanische Belastung gefunden werden (Tardieu et al., 1991).

Die zentralen Aspekte für die Pflanze bei der Wiederbewässerung sind die Vitalität der Wurzelmasse und -beschaffenheit, die Bodenzusammensetzung sowie die zugeführte Wassermenge. Letztere war identisch und die Vorangegangenen werden im Folgenden diskutiert. Creelmann et al. zeigten 1990 an *Glycine max (L.) Merr. cv Williams*, dass das Wurzelwachstum nur geringfügig durch ein geringes Wasserpotenzial beeinflusst wird, während das Hypocotyl im Wuchs vermindert ist. Eine bis zu 10-fache Abscisinsäure-Akkumulation

konnte nachgewiesen werden. Dieses war aber nicht der Auslöser für die veränderte Konzentration an löslichen Zuckern und Polysomen und geringerem Wasserpotenzial (Creelman et al., 1990).

Der verminderte Wuchs des Stängels konnte bei *Glycin max L.* (Abb. 4.28 B) unter Trockenstress nicht nachgewiesen werden. Bei *Zea mays* wurde eine Wuchsverschiebung im Vergleich zur positiven Kontrolle in 60:21:54:36:30 der Fälle für positive Kontrolle: negative Kontrolle: simultane Stimulation: Hitzestimulus: Wiederbewässerung unter Trockenstress gefunden.

Laut Zhu war 2002 die Reaktion des Trockenstresses schlechter erforscht als die des Salzstress, da bestimmte Effekte auftreten, die nicht im kausalen Zusammenhang stehen müssen. Dennoch beschreibt er, dass Abscisinsäure unter Trockenstress akkumuliert und den Wasserhaushalt reguliert. Allerdings müssten für das Verständnis des Signalweges die Akzeptoren und Rezeptoren bekannt sein (Zhu, 2002).

Chaves et al. (2002) beschreiben, dass verschiedene Arten unterschiedliche Kapazitäten zur Wassergewinnung aufwiesen, die nicht auf den jeweiligen Stoffwechsel bezogen werden können (Chaves et al., 2002). Eine Idee zur Erklärung der Wachstumsminderung unter Trockenstress wäre der geringere Turgordruck. Bartlett et al. (2012) zeigten, dass es der Turgordruck ist, der die Welkebildung bestimmt (Bartlett et al., 2012).

Masi et al. (2009) untersuchten die elektrische Signalweiterleitung an Maiswurzelspitzen. Dabei wurden sowohl spontane als auch induzierte Signale beobachtet. Die Ergebnisse wurden dahingehend interpretiert, dass in Pflanzen erregbare Wanderwellen in Form von synchronen elektrischen Aktivitäten, ähnlich tierischen, auftreten (Masi et al., 2009).

Baluska et al. (1996) verstanden den Bereich der wachsenden Wurzelzone als Sensor für sich verändernde Umweltbedingungen und für die Überwachung sowie die Anpassung (Baluska et al., 1996).

Dies würde die Überlegungen stützen, dass die Signalverarbeitung des Trockenstresses nach Wiederbewässerung über das Wurzelsystem erfolgt.

#### 5.2.4 Kombinierte Reizverarbeitung, wie geht die Pflanze damit um?

Zunächst soll das Verständnis der Signalverarbeitung und Weiterleitung im pflanzlichen Gewebe vertieft werden:

Wie die Autoren Fromm und Lautner (2007) in ihrem Review vorstellten, werden verschiedene Techniken zu intra- und extrazellulären Messungen von elektrischen Signalen an Pflanzen verwendet. Mit besonderem Augenmerk auf die Blattlaustechnik, die bereits an *Zea mays* eingeführt worden war (Fromm und Bauer, 1994), für die Messungen in intaktem Phloem, bei dem das abgetrennte Stilett der Blattlaus als effektive Salzbrücke zwischen

dem Zytoplasma und der Mikroelektrode dient. Beim Durchstechen der Zellmembran entsteht ein Ruhemembranpotential von -80 bis -200 mV in Pflanzenzellen. Die Autoren sehen eine große Relevanz in intrazellulären Ableitungen intakter Siebelemente für die Erfassung von Signalen mit hohen Geschwindigkeiten (Fromm und Lautner, 2007). Diese hätte auch in der vorliegenden Arbeit Verwendung finden können, um garantieren zu können, dass die intrazellulären Messungen im Phloem stattfinden. Allerdings ist die Nutzung von Glasmikroelektroden mit dem entsprechenden Ruhepotential und dem Einstechen in die Mittellamelle eine gleichermaßen etablierte Methode.

Fromm und Eschrich beobachteten an *Mimosa pudica* nach Stimulation der Fiederblätter Ionenverschiebungen mit einhergehendem Abfall des Turgordruckes in den Pulvini der Extensorzellen. Im primären Pulvini wird  $K^+$  aus dem äußeren Extensor sekretiert und im tertiären Pulvini  $Ca^{2+}$ . Unter Betrachtung der  $K^+ : Cl^-$ -Verhältnisse ergab sich, dass die Ladungen (positive und negative) nicht im Gleichgewicht waren (Fromm und Eschrich, 1988). Siebröhrchen-Exsudate enthalten typischerweise hohe  $K^+$ -Konzentrationen; Messungen an Gerstenblättern ergaben Werte zwischen 50 und 110 mM (Fromm und Eschrich, 1988).

Von Krol et al. (2007) wurde an *Conocephalum conicum* (Leberwurz) gezeigt, dass durch die Aminosäuren Glutamat (Glu) und Glycin (Glycin, Gly) Ruhepotentiale hyperpolarisiert und Aktionspotenziale verstärkt werden können. Dabei wurde der Leberwurz mit Glutamatlösungen mit steigenden Konzentrationen von 0,01 mM bis 20 mM behandelt. Beide Aminosäuren zusammen wirkten synergetisch auf die Induktion von Aktionspotentialen. Dabei konnte die Aminosäure Aspartat (Asp) nicht als Ersatz dienen. Die Autoren sahen die Glu-induzierte Depolarisation und Hyperpolarisierung als unabhängige Prozesse (Krol et al., 2007).

In diesem Zusammenhang wurde von Hedrich et al. (2016) festgestellt, dass zwei Glutamatrezeptor-ähnliche Gene (GLR3.3 und 3.6) an der Ausbreitung elektrischer Aktivität von den verletzten zu den intakten Blättern beteiligt sind. Aktionspotenziale im Phloem werden jedoch unabhängig von diesen Glutamatrezeptoren initiiert und propagiert (Hedrich et al., 2016). Die Autoren schlugen vor, dass weitere Ionenkanäle nach Erreichen eines Schwellenwertes durch Depolarisation aktiviert werden, die das Aktionspotential induzieren und dieses somit über das Phloem leiten. Dabei muss eine Umwandlung in ein systemisches Signal ( $Ca^{2+}$ ) geschehen, damit sich das Potenzial auf unverletztes Gewebe übertragen kann.

Laut van Bel et al. (2011) ist bei der elektrischen Langstreckensignalweiterleitung der Einstrom von  $Ca^{2+}$  der entscheidende Übermittler zwischen physikalischen und chemischen Signalen in den Siebröhren und den benachbarten Zellen. Dies setzt ein Zusammenspiel zwischen Hyperpolarisationen, Depolarisationen und mechanosensitiven  $Ca^{2+}$  Kanälen der Plasmamembran und  $Ca^{2+}$  Kanälen der Membran der Siebelemente voraus. Bei Über-

schreitung eines  $\text{Ca}^{2+}$  Schwellenwertes der Siebelemente, werden diese durch Proteine und Callose-Ablagerung reversibel oder bei hydraulischen Signalen teilweise verschlossen (van Bel et al., 2011).

Bereits Niinemets (2010) erkannte in seinem Review, dass eine Untersuchung verschiedener Kombinationen aus abiotischen und biotischen Stressfaktoren nötig ist. Er selbst fand bei Bäumen, dass kombinierte Stresssituationen das Überleben großer Bäume noch stärker beeinflussen können als chronische Expositionen mit einem einzigen vorhersagbaren Stress wie Dürre. Darüber hinaus steigt die Toleranz der Bäume gegenüber vielen Umweltbelastungen in der gesamten Ontogenese als Folge der Anhäufung nichtstruktureller Kohlenstoffpools an, was bedeutende Änderungen in der Erfassung, Reaktion und Eingewöhnung an einzelne und mehrfache Belastungen in Bäumen unterschiedlicher Größe und Alter nach sich zieht (Niinemets, 2010).

Die mehrfache Verarbeitung von unterschiedlichen zeitgleichen Reizen ist bis jetzt wenig erforscht. Dies ist vermutlich dadurch bedingt, dass in der Natur viele Stimuli nicht kombiniert auftreten. Als Ergebnis des Gaswechsels und der Potenzialmessungen ergab sich ausgelöst durch die Potenziale bzw. Hyperpolarisation ein kombinierter Verlauf, der sich auf Grundlage der Beobachtungen von Dickob (1991) daraus ergibt, dass nach ungefähr 20 Minuten unter Verwendung von Anstaubewässerung der Boden mit Wasser gesättigt ist (Dickob, 1991). Dies spricht dafür, dass durch den ausgedörrten Boden das Wasser für die Wurzeln nicht unmittelbar verfügbar ist und deshalb eine verzögerte Reaktion des elektrischen Signals auftrat. Das hydraulische Signal war unmittelbar nach der Wiederbewässerung zu messen sowie das durch den Feuerreiz induzierte Variationspotenzial, welches direkt weitergeleitet wird und Einfluss auf die Photosyntheserate hat.

Vodeneev et al. (2016) schlossen auf Grundlage anderer Studien auf einen Zusammenhang zwischen dem Typ eines elektrischen Signals und der dadurch induzierten Antwort, dabei sahen sie den jeweiligen Ionenspiegel als Antwort bestimmend (Vodeneev et al., 2016). Dies passt zu der Beobachtung, dass die Kombination zweier Reize eine kombinierte Antwort generiert.

Im vorliegenden Versuch ergaben sich wie zuvor erwähnt für den Hitzereiz basipetal  $1,25 \text{ cm s}^{-1}$ , für die Wiederbewässerung nach Trockenstress in akropetaler Richtung eine Geschwindigkeit von  $3,6 \text{ cm s}^{-1}$  und für die simultane Stimulation  $0,61 \text{ cm s}^{-1}$ . Dies entspricht durch die Kombination beider Stimuli einer Verzögerung der zuvor gemessenen Geschwindigkeiten der Einzelreize. Damit werden die Überlegungen von Hedrich et al. (2016) gestützt, dass ein Schwellenwert für die Signalweiterleitung erreicht werden muss (Hedrich et al., 2016). Die Speicherbarkeit von Informationen im pflanzlichen Gewebe (Desbiez et al., 1992) unterstellt Pflanzen eine gewisse Fähigkeit der Wahrnehmung, welche wiederum die differenzierte Reizverarbeitung von unterschiedlichen theoretisch bekannten

Reizen wahrscheinlich macht.

Bezüglich des Gaswechsels nahm die Transpiration immer denselben Verlauf wie die stomatare Leitfähigkeit. Zum einen, da über den Wassergehalt im Luftstrom die Leitfähigkeit berechnet wird und zum anderen da weiter geöffnete Stomata physiologisch eine stärkere Transpiration bedingen. Dies würde aber auf der anderen Seite auch eine stärkere CO<sub>2</sub> Aufnahme im Zuge der Photosynthese hervorrufen. Eine stärkere Veränderung der interzellulären CO<sub>2</sub> Konzentration ist durch den Hitzestimulus bzw. simultaner Stimulation zu beobachten gewesen. Diese verläuft meist gegenläufig zu den drei anderen Gaswechselfparametern. Hingegen hatte die Wiederbewässerung einen geringen Einfluss auf die interzelluläre CO<sub>2</sub> Konzentration (Abb. 4.16 B.II und 4.17 B.II). Wobei sich durch die geringeren Photosyntheseparameter auch hier widerspiegelt, dass *Glycine max* (L.) nicht annähernd so Trockenstress tolerant ist wie *Zea mays*.

Bei der simultanen Stimulation im Vergleich zu denen der mit Feuer und Wiederbewässerung gereizten Pflanzen ergibt sich ein kombinierter Verlauf (z. B. Abb. 4.17 A).

### 5.2.5 Die Reize und ihr Einfluss auf den Wuchs

Bei der Untersuchung des circadianen Rhythmus war es möglich die Vitalität der unter Trockenstress leidenden Pflanzen zu zeigen, ebenso konnten von Stankovic et al. (1998) durch das An- bzw. Ausschalten der Lichtquelle elektrische Potenziale gemessen werden, die einer De- und Hyperpolarisation der Plasmamembran entsprachen (Stankovic et al., 1998).

Von besonderem Interesse war, ob und wie die unterschiedlichen Stimuli den Reiz beeinflussten. Eine kurzzeitige Beeinflussung des Wachstums vor bzw. nach dem Reiz war ebenso messbar, allerdings nicht in den Wachstumsversuchen über den gesamten Zeitraum. Mit Hilfe des 3-Achs-Roboters war es gelungen ein nicht invasives Verfahren mit automatischer Fokuseinstellung zur Wachstumsbestimmung zu generieren (Kapitel 4.2.7). Vermutlich waren die Stimuli entweder zu temporär oder nicht letal, um eine veränderte Genexpression zur Folge zu haben. Es wäre möglich, dass keine weiteren Stresshormone mehr ausgeschüttet wurden, da Trockenstress ein für die Pflanzen zu „normaler Zustand“ ist, an den sich der *Zea mays* bedingt durch den C<sub>4</sub>-Metabolismus gut adaptiert hat. Obwohl sich Unterschiede unmittelbar am Tag nach dem Reiz im prozentualen Zuwachs bei beiden Spezies ergeben hatten, konnten diese zur Ernte bei Bestimmung der Biomasse nicht mehr gefunden werden. Zwischen dem Reiz und der Ernte lagen im Durchschnitt 6 Tage ± 1,4 Tage. Ebenso wurde von Blum in seinem 2016 erschienen Review zu Getreidearten für *Zea mays* zusammengefasst, dass Pflanzen, die unter Trockenstress gelitten hatten, nach Bewässerung die gleiche Ausbeute zeigten (Blum, 2017).

Zusätzlich sorgen einzelne Berührungen schon für eine Wuchsreduktion der entsprechenden Pflanze (siehe Kapitel 5.1). Durch die Vermessung und damit einhergehenden Berührung aller Pflanzen und Varianten am selben Tag, kann der dadurch entstandenen systemische Fehler vernachlässigt werden.

Im Bezug auf die Elementzusammensetzungen war durch die optische Emissionsspektrometrie die Untersuchung des Einflusses der unterschiedlichen Stimuli auf die Ionenkonzentrationen möglich. Besonders prominent war der Anstieg im  $\text{Na}^+$ -Gehalt aller anderen Varianten gegenüber der positiven Kontrolle (Abb. 4.32). Wie von Xi et al. 2018 an *Zygophyllum xanthoxylum* gezeigt wurde, ist die Akkumulation von  $\text{Na}^+$  hauptsächlich im Blattgewebe möglich, auch wenn der Boden nur geringe Mengen enthält und der Anpassung beim Trockenstress durch eine Vergrößerung der Mesophyllzellen und damit einhergehender Wasserspeicherkapazität dient (Xi et al., 2018). Dies erklärt den Anstieg an  $\text{Na}^+$  bei der negativen Kontrolle und der Wiederbewässerungs- sowie simultan stimulierten Variante, die auch zeitweise unter Trockenstress litt, wirft allerdings die Frage auf, warum die hitzestimulierte Variante am meisten  $\text{Na}^+$  akkumuliert hatte und in einer viel größeren Menge als die gleichzeitig gereizten Pflanzen. Die Vermutung liegt nahe, dass das Verbrennen des Blattgewebes dafür gesorgt hatte, allerdings hätte dann diese auch bei der simultan stimulierten Probe gefunden werden müssen. Im Bezug auf die Gefäßstruktur im Blatt hätten sich allein durch die erhöhte  $\text{Na}^+$ -Konzentration Veränderungen ergeben müssen.

Aloni sah 1987 die Anpassung der Gefäßdurchmesser durch Bildung von neuen Gefäßen auf veränderte Umweltbedingungen als notwendig, um einen Transport von Wasser und Mineralien von der Wurzel zum Blatt gewährleisten zu können. Zusätzlich beobachtete er Ähnlichkeiten in der Struktur des Gefäßsystems bei Pflanzen, die in extremen Lebensräumen wachsen, gegenüber denen, die in mesomorphen Umgebungen wachsen (Aloni, 1987). Dies hätte eine Veränderung der Gefäßstrukturen der im Versuch verwendeten Individuen zur Folge haben können. Allerdings vermutlich nur bei den im Versuchen länger Verbliebenen, was wiederum die jungen Pflanzen aus den Wachstumsversuchen ausschließt.

#### 5.2.5.1 Betrachtung der C/N Verschiebung im Gewebe

In der bereits veröffentlichten Literatur waren wenige Daten zum Thema C/N Veränderungen bedingt durch die kombinierten Reize zu finden, sodass sich im folgenden Abschnitt auf die Einordnung der möglichen Beeinflussung des N- bzw. C-Gehaltes beschränkt wird. Evans (1989) stellte eine Verbindung der Photosyntheseleistung mit dem Stickstoffgehalt der Blätter in  $\text{C}_3$  Pflanzen her, die er damit begründete, dass die Proteine des Calvin-



Zyklus und der Thylakoiden den größten Anteil des Blattstickstoffes ausmachen. Allerdings verändert sich mit steigendem Stickstoffgehalt pro Blattfläche der Thylakoideanteil nicht im Gegensatz zum löslichen Protein (Evans, 1989).

Dies beschreiben Farquhar und von Caemmerer 1982 ebenfalls, indem sie einen starken Zusammenhang zwischen der RubisCO-Konzentration im Blatt und dem Gesamtblattstickstoff sahen. Dabei nahmen sie eine Aufteilung in lösliche und membranassoziierte Proteine der Thylakoiden vor, die funktionell die Hell- und Dunkelreaktion der Photosynthese abbilden (Farquhar und von Caemmerer, 1982).

Laut Evans (1989) gibt es Arten-abhängige Unterschiede der Photosyntheleistung je Stickstoffeinheit. Er stellte dar, dass Weizen und Reis die höchsten Raten der CO<sub>2</sub> Assimilation des Stickstoffs von bis zu 120 mmol m<sup>-2</sup> haben (Evans, 1989). Dies entspricht den gewonnenen Ergebnisse, da es bedeutet, dass die Getreide *Glycin max L.* bzw. *Zea mays* einen höheren Stickstoffgehalt als *Mimosa pudica* hatten.

In *Zea mays* liegt der Stickstoffgehalt im Durchschnitt bei 5,35 % und der Kohlenstoffgehalt durchschnittlich bei 36,27 %. In den *Zea* Wurzeln lag dieser bei 1,46 % und 41,59 %. *Glycin max L.* zeigte hingegen einen erhöhten Stickstoffgehalt von durchschnittlich 6,14 % und der Kohlenstoffgehalt lag bei 39,51 %. Im Bezug auf den C/N Quotienten lag bei den Blättern der *Mimosa pudica* der Stickstoffgehalt im Durchschnitt bei 2,36 % und der Kohlenstoffgehalt bei 42,55 %. Hier trifft es zu, dass bei *Zea mays* durch den induzierten Trockenstress Verschiebungen des N-Gehaltes, wie von Dina und Klikoff 1973 beschrieben, entstanden sein können (Diana und Klikoff, 1973).

2009 postulierten Lu et al., dass Trockenstress den C/N Quotienten in Blättern von Bäumen senkt. Dabei war eine Verschiebung des Kohlenstoffgehaltes durch Verringerung in größerer Höhe auf die Wurzeln zu beobachten (Lu et al., 2009). Dies widerspricht den hier dargestellten Ergebnissen, da die negative Kontrolle in diesem Fall bei allen Untersuchungen den geringsten C/N Quotienten hätte haben müssen. Zusätzlich hätten auch in der wiederbewässerten Variante signifikante Unterschiede entstehen müssen.

Bei beiden untersuchten Arten hatte sich durch die Verwendung der unterschiedlichen Stimuli keine Veränderung der Kohlenstoff- bzw. Stickstoffgehalte im oberirdischen Gewebe ergeben.

### 5.3 Fazit

Eine Varianz der unterschiedlichen Arten und Pflanzen sowie Versuchsdurchläufe ergibt sich durch die biologischen Charakteristika jedes Individuums. Die wichtigsten Ergebnisse dieser Arbeit sind wie folgt:

- (i) Die Rotation entspricht dem Reiz der Thigmomorphogenese mit vermindertem



Wuchs.

- (ii) Das rotierte Gewebe zeigte einen geringeren Stickstoffgehalt.
- (iii) Die *Mimosa* reagierten mit Reizadaption auf die Rotation
- (iv) Die simultane Stimulation mit Hitze und Wiederbewässerung nach Trockenstress ergibt einen kombinierten zeitlich versetzten Verlauf auf Potenzial- und Gaswechselebene.



# KAPITEL 6

---

## Ausblick

---

Auf Grundlage der gewonnenen Erkenntnisse gibt es weitere Aspekte die untersucht werden könnten und für die Wissenschaftsgemeinschaft von Interesse wären. Diese werden im Folgenden kurz Zusammengefasst:

- Niederfrequente Schallwellenanalyse als Rotationsersatz  
Erzeugen die Schwingungen im Wuchs und Gewebe den gleichen Effekt wie die Rotation?
- Erhöhung der g-Kraft über  $9,81 \text{ m s}^{-2}$  während der Rotation  
Auswirkungen auf das pflanzliche Wachstum durch eine stärkere als die auf der Erde wirkende Gewichtskraft.
- THz Untersuchungen der Reizverarbeitung  
Weitere Untersuchungen der verschiedenen Stimuli mittels Transmissionsmessungen im Terahertz Bereich, um Verschiebungen des Wassers im Blattgewebe oder der gesamten Pflanze beobachten zu können.
- Molekurbioologische Untersuchungen der Phytohormone bei simultaner Stimulation  
Bestimmung der Signalwege und des Phytohormon-Zusammenspiels bei simultaner Stimulation. Wirkt Abscisinsäure im gleichen Maß wie bei der Wiederbewässerung und welche Rolle spielt Jasmonat beim Feuerreiz?
- Reizkombination und Gefäßveränderung  
Nach Aloni (1987) und durch die erhöhte  $\text{Na}^+$ -Konzentration müssten sich veränderte Strukturen im Stängel und den Blättern der Pflanzen ergeben. Diese könnten untersucht werden.
- Reproduktion der ICP-OES Ergebnisse des hitzestimulierten Gewebes

Ursachenforschung für erhöhte  $\text{Na}^+$ -Konzentration nach Hitzestimulus im Blattgewebe.

- Reaktionen auf weitere Reizkombinationen

Welche Antworten auf elektrophysiologischer Ebene der Pflanzen ergeben sich bei weiteren Reizkombinationen.

---

## Literaturverzeichnis

---

- Allen, R. D.** (1969). Mechanism of the Seismonastic Reaction in *Mimosa pudica*. *Plant Physiol*, **44**:1101–1107. (Zitiert auf Seite [15](#))
- Aloni, R.** (1987). Differentiation of vascular tissues. *Ann Rev Plant Physiol*, **38**:179–204. (Zitiert auf Seiten [103](#) and [115](#))
- Baluska, F., Volkmann, D., und Barlow, P. W.** (1996). Specialized zones of development in roots: view from the cellular level. *Plant Physiol*, **112**:3–4. (Zitiert auf Seite [111](#))
- Baluska, F., Volkmann, D., und Menzel, D.** (2005). Plant synapses: actin-based domains for cell-to-cell communication. *Trends Plant Sci*, **10**:106–111. (Zitiert auf Seite [17](#))
- Bartlett, M. K., Scoffoni, C., und Sack, L.** (2012). The determinants of leaf turgor loss point and prediction of drought tolerance of species and biomes: a global meta-analysis. *Ecol Lett*, **15**:393–405. (Zitiert auf Seiten [11](#) and [111](#))
- Bautsch** (2015). Parameter der Abbildungsgleichung bei einem konvergenten Strahlengang. [de.wikibooks.org](https://de.wikibooks.org). <https://de.wikipedia.org/wiki/Datei:Abbildungsgleichung.png> Stand: 14.03.2019, 17:53 Uhr. (Zitiert auf Seite [80](#))
- van Bel, A. J. E., Knoblauch, M., Furch, A. C. U., und Hafke, J. B.** (2011). (Questions)<sup>n</sup> on phloem biology. 1. Electropotential waves, Ca<sup>2+</sup> fluxes and cellular cascades along the propagation pathway. *Plant Sci*, **181**:210–218. (Zitiert auf Seite [113](#))
- Blum, A.** (2017). Osmotic adjustment is a prime drought stress adaptive engine in support of plant production. *Plant Cell Environ*, **40**:4–10. (Zitiert auf Seite [114](#))
- Bünning, E.** (1953). *Entwicklungs- und Bewegungsphysiologie der Pflanze*. Springer, **3**:375–376. (Zitiert auf Seite [51](#))
- Born, N., Liepelt, D. B. S., Beyer, S., Schwerdtfeger, M., Ziegenhagen, B., und Koch, M.** (2014). Monitoring plant drought stress response using terahertz time-domain spectroscopy. *Plant Physiol*, **164**:1571–1577. (Zitiert auf Seite [20](#))

- Braam, J.** (2005). In touch: Plant responses to mechanical stimuli. *New Phytol*, **165**:373–389. (Zitiert auf Seiten [21](#) and [101](#))
- Bresinsky, A., Körner, C., Kadereit, J. W., Neuhaus, G., und Sonnewald, U.** (2008). *Strasburger - Lehrbuch der Botanik*. Spektrum, **36** Edition. 886. (Zitiert auf Seiten [13](#), [14](#), and [15](#))
- Burg, S. P. und Burg, E. A.** (1966). The interaction between auxin and ethylene and its role in plant growth. *Proc natl Acad Sci*, **55**:262–269. (Zitiert auf Seite [101](#))
- Canny, M. J. P.** (1975). *Encyclopedia of plant physiology: Mass transfer*. Springer, **1** Edition. 139-153. (Zitiert auf Seite [83](#))
- Chaves, M. M., Pereira, J. S., Maroco, J., Rodrigues, M. L., Ricardo, C. P., Osorio, M. L., Carvalho, I., Faria, T., und Pinheiro, C.** (2002). How Plants Cope with Water Stress in the Field. *Photosynthesis and Growth. Ann Bot*, **89**:907–916. (Zitiert auf Seiten [7](#) and [111](#))
- Chee, F. P., Chen, C. A., Chang, J. H. W., Choo, Y. Y., und Dayou1, J.** (2016). Data Acquisition System for *In Situ* Monitoring of Chemolectrical Potential in Living Plant Fuel Cells. *J Biophys*, **2016**:1–7. (Zitiert auf Seite [8](#))
- Chehab, E. W., Yao, C., Henderson, Z., Kim, S., und Braam, J.** (2012). Arabidopsis touch-induced morphogenesis is jasmonate mediated and protects against pests. *Current Biology*, **22**:701–706. (Zitiert auf Seite [102](#))
- jr Cipollini, D. F.** (1997). Wind-induced mechanical stimulation increases pest resistance in common bean. *Oecologia*, **111**:84–90. (Zitiert auf Seite [102](#))
- Cowan, I. R. und Farquhar, G. D.** (1977). Stomatal function in relation to leaf metabolism and environment. *Symp Soc Exp Biol*, **31**:471–505. (Zitiert auf Seite [6](#))
- Creelman, R. A., Mason, H. S., Bensen, R. J., Boyer, J. S., und Mullet, J. E.** (1990). Water Deficit and Abscisic Acid Cause Differential Inhibition of Shoot *versus* Root Growth in Soybean Seedlings. *Plant Physiol*, **92**:205–214. (Zitiert auf Seite [111](#))
- Darwin, C.** (1875). *Insectivorous Plants*. John Murray, **1** Edition. (Zitiert auf Seite [16](#))
- Darwin, C.** (1881). *The power of movement in plants*. New York: D. Appleton and Company, **1** Edition. 156-161, 192. (Zitiert auf Seite [100](#))
- Davies, E.** (1987). Action potentials as multifunctional signals in plants: a unifying hypothesis to explain apparently disparate wound responses. *Plant Cell Environ*, **10**:623–631. (Zitiert auf Seite [18](#))

- Davies, E.** (1993). Intercellular and intracellular signals and their transduction via the plasma membrane-cytoskeleton interface. *Semin Cell Biol*, **4**:139–147. (Zitiert auf Seite 17)
- Davies, E.** (2004). New functions for electrical signals in plants. *New Phytol*, **161**:607–610. (Zitiert auf Seiten 18, 107, and 108)
- Davies, E.** und **Stankovic, B.** (2006). Electrical signals, the cytoskeleton, and gene expression: a hypothesis on the coherence of the cellular responses to environmental insult. Springer, 1 Edition. 309-320. (Zitiert auf Seite 18)
- Desbiez, M. O., Boyer, N., und Thellier, M.** (1992). Les messages de croissance chez les plantes. *La Recherche*, **23**:88–196. (Zitiert auf Seiten 104 and 113)
- Diana, S. J. und Klikoff, L. G.** (1973). Effect of Plant Moisture Stress on Carbohydrate and Nitrogen content of Big Sagebrush. *J Range Manage*, **26**:207–209. (Zitiert auf Seiten 103 and 116)
- Dickob, D.** (1991). Feuchte-Messung in Topf-Substraten: Messmethode - Messergebnisse - Folgerung. *Deutscher Gartenbau*, **39**:2394–2396. (Zitiert auf Seite 113)
- Dziubinska, H., Filek, M., Koscielniak, J., und Trebacz, K.** (2003). Variation and action potentials evoked by thermal stimuli accompany enhancement of ethylene emission in distant non-stimulated leaves of *Vicia faba* minor seedlings. *Plant Physiol*, **160**:1203–1210. (Zitiert auf Seiten 12 and 19)
- Evans, J. R.** (1989). Photosynthesis and nitrogen relationships in leaves of C<sub>3</sub> plants. *Oecologia*, **78**:9–19. (Zitiert auf Seite 116)
- Evert, R. F., Eichhorn, S. E., und Langenfeld-Heyser, R.** (2009). Esaus Pflanzenanatomie: Meristeme, Zellen und Gewebe der Pflanzen - ihre Struktur, Funktion und Entwicklung. De Gruyter, 1 Edition. (Zitiert auf Seite 7)
- Farquhar, G. D. und von Caemmerer, S.** (1982). Modelling of photosynthetic response to environmental conditions. Springer, 12 Edition. 550-587. (Zitiert auf Seite 116)
- Favre, P., Krol, E., Stolarz, M., Szarek, I., Trebacz, H. G. K., und Agosti, R. D.** (1999). Action potentials elicited in the liverwort *Conocephalum conicum* (Hepaticae) with different stimuli. *Arch Sci*, **52**:175–185. (Zitiert auf Seite 106)
- Frietsch, M.** (2018). Mais. ARD Planetwissen. [https://www.planet-wissen.de/gesellschaft/lebensmittel/mais\\_ein\\_korn\\_fuer\\_alle\\_faelle/index.html](https://www.planet-wissen.de/gesellschaft/lebensmittel/mais_ein_korn_fuer_alle_faelle/index.html)  
Stand: 02.04.2019, 18:27 Uhr. (Zitiert auf Seite 15)

- Fromm, J.** (1991). Control of phloem unloading by action potentials in *Mimosa*. *Physiol Plantarum*, **83**:529–533. (Zitiert auf Seite [104](#))
- Fromm, J.** und **Bauer, T.** (1994). Action potentials in maize sieve tubes change phloem translocation. *J Exp Bot*, **45**:463–469. (Zitiert auf Seiten [18](#), [110](#), and [111](#))
- Fromm, J.** und **Eschrich, W.** (1988). Transport processes in stimulated and non-stimulated leaves of *Mimosa pudica*. *Trees-Struct Funct*, **2**:18–24. (Zitiert auf Seite [112](#))
- Fromm, J.** und **Fei, H.** (1998). Electrical signaling and gas exchange in maize plants of drying soil. *Plant Sci*, **132**:203–213. (Zitiert auf Seite [73](#))
- Fromm, J.**, **Hajirezaei, M.-R.**, **Becker, V. K.**, und **Lautner, S.** (2013). Electrical signaling along the phloem and its physiological responses in the maize leaf. *Front Plant Sci*, **4**:239. (Zitiert auf Seite [110](#))
- Fromm, J.** und **Lautner, S.** (2007). Electrical signals and their physiological significance in plants. *Plant Cell Environ*, **30**:249–257. (Zitiert auf Seiten [38](#) and [112](#))
- Gagliano, M.**, **Renton, M.**, **Depczynski, M.**, und **Mancuso, S.** (2014). Experience teaches plants to learn faster and forget slower in environments where it matters. *Oecologia*, **175**:63–72. (Zitiert auf Seite [104](#))
- Gallé, A.**, **Lautner, S.**, **Flexas, J.**, und **Fromm, J.** (2015). Environmental stimuli and physiological responses: The current view on electrical signalling. *Environ Exp Bot*, **114**:15–21. (Zitiert auf Seiten [16](#), [17](#), [19](#), and [109](#))
- Gallé, A.**, **Lautner, S.**, **Flexas, J.**, **Ribas-Carbo, M.**, **Hanson, D.**, **Roesgen, J.**, und **Fromm, J.** (2013). Photosynthetic responses of soybean (*Glycine max L.*) to heat-induced electrical signalling are predominantly governed by modifications of mesophyll conductance for CO<sub>2</sub>. *Plant Cell Environ*, **36**:542–552. (Zitiert auf Seite [107](#))
- Gardiner, B.**, **Berry, P.**, und **Moulija, B.** (2016). Review: Wind impacts on plant growth, mechanics and damage. *Plant Sci*, **245**:94–118. (Zitiert auf Seiten [21](#), [100](#), and [102](#))
- Garner, L. C.** und **Björkman, T.** (1996). Mechanical Conditioning for Controlling Excessive Elongation in Tomato Transplants: Sensitivity to Dose, Frequency, and Timing of Brushing. *J Am Soc Hort Sci*, **121**:894–900. (Zitiert auf Seite [100](#))
- Genaust, H.** (2005). Etymologisches Wörterbuch der botanischen Pflanzennamen. Nikol, **3** Edition. (Zitiert auf Seite [15](#))
- Gente, R.** (2016). Wasserstatusüberwachung an Nutzpflanzen mittels THz-Spektroskopie. Dissertation, Philipps-Universität Marburg. (Zitiert auf Seiten [21](#), [105](#), and [106](#))



- Gente, R.** und **Koch, M.** (2015). Monitoring leaf water content with THz and sub-THz waves. *Plant Methods*, **11**:1–9. (Zitiert auf Seite 20)
- Goldsworthy, A.** (1983). The Evolution of Plant Action Potentials. *J theor Biol*, **103**:645–648. Eds. A. G. Volkov. (Zitiert auf Seite 18)
- Gora, E. M.** und **Yanoviak, S. P.** (2015). Electrical properties of temperate forest trees: a review and quantitative comparison with vines. *Can J For Res*, **45**:236–245. (Zitiert auf Seite 16)
- Grams, T. E. E., Koziol, C., Lautner, S., und Fromm, J.** (2007). Distinct roles of electric and hydraulic signals on the reaction of leaf gas exchange upon re-irrigation in *Zea mays L.* *Plant Cell Environ*, **30**:79–84. (Zitiert auf Seite 109)
- Grams, T. E. E., Lautner, S., Felle, H. H., Matyssek, R., und Fromm, J.** (2009). Heat-induced electrical signals affect cytoplasmic and apoplastic pH as well as photosynthesis during propagation through the maize leaf. *Plant Cell Environ*, **32**:319–326. (Zitiert auf Seite 107)
- Hübers, H.-W.** (2009). Terahertz-Wellen. *Welt der Physik*. <https://www.weltderphysik.de/gebiet/teilchen/licht/elektromagnetisches-spektrum/terahertz-wellen/> Stand: 04.04.2019, 12:23 Uhr. (Zitiert auf Seite 20)
- Hedrich, R., Salvador-Recatalà, V., und Dreyer, I.** (2016). Electrical Wiring and Long-Distance Plant Communication. *Trends Plant Sci*, **21**:376–387. (Zitiert auf Seiten 112 and 113)
- Herde, O., Peña-Cortés, H., Fuss, H., Willmitzer, L., und Fisahn, J.** (1999). Effects of mechanical wounding, current application and heat treatment on chlorophyll fluorescence and pigment composition in tomato plants. *Physiol Plantarum*, **105**:179–184. (Zitiert auf Seite 108)
- Heyland, K.-U.** (1996). Spezieller Pflanzenbau: Landwirtschaftliches Lehrbuch. Ulmer, 7 Edition. 132. (Zitiert auf Seite 14)
- Hlavackova, V., Krchnak, P., Naus, J., Spundova, M., und Strnad, M.** (2006). Electrical and chemical signals involved in short-term systemic photosynthetic responses of tobacco plants to local burning. *Planta*, **225**:235–244. (Zitiert auf Seite 108)
- Hoem, J. M.** (2008). The reporting of statistical significance in scientific journals: A reflexion. *Demogr Res*, **18**:437–442. (Zitiert auf Seite 105)

- Jaffe, M. J.** (1973). Thigmomorphogenesis: The Response of Plant Growth and Development to Mechanical Stimulation. *Planta (Berl.)*, **114**:143–157. (Zitiert auf Seiten [21](#), [99](#), [100](#), and [101](#))
- Johnson, P. R.** und **Ecker, J. R.** (1998). The ethylene gas signal transduction pathway: a molecular perspective. *Annu Rev Genet*, **32**:227–254. (Zitiert auf Seite [101](#))
- Karpowicz, N., Zhong, H., Zhang, C., Lin, K.-I., Hwang, J.-S., Xu, J., und Zhang, X.-C.** (2005). Compact continuous-wave subterahertz system for inspection applications. *Appl Phys Lett*, **86**:054105. (Zitiert auf Seite [21](#))
- Kirkham, M. B.** (2005). Measurement of Water-Use Efficiency. *Encyclopedia of Soils in the Environment*, **1**:315–322. (Zitiert auf Seite [6](#))
- Koch, M., Hunsche, S., Schumacher, P., Nuss, M. C., Feldmann, J., und Fromm, J.** (1998). THz-imaging: a new method for density mapping of wood. *Wood Sci Technol*, **32**:421–427. (Zitiert auf Seite [20](#))
- Koch, M., Schmalstieg, K., Knobloch, P., Hunsche, S., Nuss, M. C., Rehberg, E., Sautter, I., Fromm, J., Hempel, M., Haferkorn, R., Libon, I., Hecker, N. E., und Feldmann, J.** (2001). Terahertz Sources and Systems: THz Imaging of Biological Samples. Springer, **27** Edition. 241-258. (Zitiert auf Seiten [20](#) and [105](#))
- Kohler, A.** (2014). Wer Soja isst, zerstört den Regenwald. *Neue Zürcher Zeitung (NZZ)*. <https://www.nzz.ch/panorama/montagsklischee/soja-wird-hauptsaechlich-fuer-tierfutter-produziert-1.18335485> Stand: 02.04.2019, 16:59 Uhr. (Zitiert auf Seite [14](#))
- Koziolk, C., Grams, T. E. E., Schreiber, U., Matyssek, R., und Fromm, J.** (2003). Transient knockout of photosynthesis mediated by electrical signals. *New Phytol*, **161**:715–722. (Zitiert auf Seiten [83](#) and [106](#))
- Krol, E., Dziubinska, H., Trebacz, K., Koselski, M., und Stolarz, M.** (2007). The influence of glutamic and aminoacetic acids on the excitability of the liverwort *Conocephalum conicum*. *Plant Physiol*, **164**:773–784. (Zitiert auf Seiten [17](#) and [112](#))
- Larcher, W.** (2001). Ökophysiologie der Pflanzen: Leben, Leistung und Stressbewältigung der Pflanzen in ihrer Umwelt. Ulmer, **6** Edition. 200-231, 290. (Zitiert auf Seiten [11](#) and [16](#))
- Lautner, S. und Fromm, J.** (2010). Calcium-dependent physiological processes in trees. *Plant Biol*, **12**:268–274. (Zitiert auf Seite [13](#))

- Lautner, S., Grams, T. E. E., Matyssek, R., und Fromm, J.** (2005). Characteristics of electrical signals in poplar and responses in photosynthesis. *Plant Physiol*, **138**:2200–2209. (Zitiert auf Seite 109)
- Lautner, S., Stummer, M., Matyssek, R., Fromm, J., und Grams, T. E. E.** (2013). Involvement of respiratory processes in the transient knockout of net CO<sub>2</sub> uptake in *Mimosa pudica* upon heat stimulation. *Plant Cell Environ*, **37**:254–260. (Zitiert auf Seite 107)
- Lee, D., Polisensky, D. H., und Braam, J.** (2005). Genome wide identification of touch and darkness-regulated Arabidopsis genes: a focus on calmodulin-like and XTH genes. *New Phytol*, **165**:429–444. (Zitiert auf Seite 101)
- Lee, G.-A., Crawford, G. W., Liu, L., Sasaki, Y., und Chen, X.** (2011). Archaeological Soybean (*Glycine max*) in East Asia: Does Size Matter? *PLoS ONE*, **6**:e26720. (Zitiert auf Seite 14)
- Li, T., Cofer, T., Engelberth, M., und Engelberth, J.** (2016). Defense Priming and Jasmonates: A Role for Free Fatty Acids in Insect Elicitor-Induced Long Distance Signaling. *Plants*, **5**:1–18. (Zitiert auf Seite 19)
- LI-COR** (2016). LI-6400XT System Photosynthesis, Fluorescence, Respiration. LI-COR®Bioscience. <https://www.licor.com/documents/ifuhfcjga0wvh94lkysz> Stand: 21.11.2018, 12:45 Uhr. (Zitiert auf Seite 40)
- Liébecq, C.** (1992). *Biochemical Nomenclature and Related Documents*. Portland Press, 2 Edition. (Zitiert auf Seite xxiii)
- Liu, Y., Schieving, F., Stuefer, J. F., und Anten, N. P. R.** (2007). The Effects of Mechanical Stress and Spectral Shading on the Growth and Allocation of Ten Genotypes of a Stoloniferous Plant. *Ann Bot*, **99**:121–130. (Zitiert auf Seite 103)
- Lüttge, U., Kluge, M., und Bauer, G.** (2005). *Botanik*. Wiley VCH Verlag, 5 Edition. 573-580. (Zitiert auf Seiten 13, 14, and 18)
- Lüttge, U., Kluge, M., und Thiel, G.** (2010). *Botanik: Die umfassende Biologie der Pflanzen*. Wiley VCH Verlag, 1 Edition. 176-178. (Zitiert auf Seite 7)
- Lu, Y., Duan, B., Zhang, X., Korpelainen, H., und Li, C.** (2009). Differences in growth and physiological traits of *Populus cathayana* populations as affected by enhanced UV-B radiation and exogenous ABA. *Environ Exp Bot*, **66**:100–109. (Zitiert auf Seite 116)

- Masi, E., Ciszak, M., Stefano, G., Renna, L., Azzarello, E., Pandolfi, C., Mugnai, S., Balus, F., Arecchi, F. T., und Mancuso, S. (2009). Spatiotemporal dynamics of the electrical network activity in the root apex. *Proc Natl Acad Sci*, **106**:4048–4053. (Zitiert auf Seite 111)
- Mattson, W. J. J. (1980). Herbivory in Relation to Plant Nitrogen Content. *Ann Rev Ecol Syst*, **11**:119–161. (Zitiert auf Seite 103)
- Matyssek, R., Fromm, J., Rennenberg, H., und Roloff, A. (2010). *Biologie der Bäume- Von der Zelle zur globalen Ebene*. UTB Ulmer, 1 Edition. 60. (Zitiert auf Seiten 7 and 11)
- Mitchell, C. (1992). Modification of plant growth and development by acceleration and vibration: Concerns and opportunities for plant experimentation in orbiting spacecraft. *Adv Space Res*, **12**:219–225. (Zitiert auf Seite 103)
- Mitchell, C. A., Severson, C. J., Wott, J. A., und Hammer, P. A. (1975). Seismomorphogenic regulation of plant growth. *J Am Soc Hort Sci*, **2**:161–165. (Zitiert auf Seiten 100 and 103)
- Müller, H. M., Schäfer, N., Bauer, H., Geiger, D., Lautner, S., Fromm, J., Riederer, M., Bueno, A., Nussbaumer, T., Mayer, K., Alquraishi, S. A., Alfarhan, A. H., Neher, E., Al-Rasheid, K. A. S., Ache, P., und Hedrich, R. (2017). Osmotic adjustment is a prime drought stress adaptive engine in support of plant production. *New Phytol*, **216**:150–162. (Zitiert auf Seite 6)
- Neugebauer, A. (2002). Dreidimensionale Registrierung circadianer und ultradianer Wachstumsvorgänge des Hypokotyls von *Arabidopsis thaliana* und *Cardaminopsis arenosa*. Dissertation, Eberhard-Karls-Universität Tübingen. (Zitiert auf Seite 40)
- Niinemets, Ü. (2010). Responses of forest trees to single and multiple environmental stresses from seedlings to mature plants: Past stress history, stress interactions, tolerance and acclimation. *Forest Ecol Manag*, **260**:1623–1639. (Zitiert auf Seite 113)
- Pflanzenforschung.de, R. (2009). Ständig unter Strom: Wie Pflanzen nervenähnliche Signalsysteme zur Reizweiterleitung nutzen. *Pflanzenforschung.de*. <https://www.pflanzenforschung.de/de/journal/journalbeitrage/staendig-unter-strom-wie-pflanzen-nervenaehnliche-signa-10006> Stand: 04.04.2019, 08:17 Uhr. (Zitiert auf Seite 18)
- Pickard, B. G. (1971). Action Potentials Resulting from Mechanical Stimulation of Pea Epicotyls. *Planta*, **97**:106–215. (Zitiert auf Seite 104)

- Pickard, B. G.** (1972). Spontaneous Electrical Activity in *Ipomoea*, *Pisum*, and *Xanthium*. *Planta*, **102**:91–114. (Zitiert auf Seiten [17](#) and [104](#))
- Pickard, B. G.** (1973). Action Potentials in higher plants. *Bot Rev*, **39**:172–201. (Zitiert auf Seite [19](#))
- Purves, W. K., Sadava, D., Orians, G. H., und Heller, H. C.** (2006). *Biologie*. Spektrum Akademischer Verlag, 7 Edition. 176–190. (Zitiert auf Seiten [7](#), [8](#), [9](#), [10](#), [13](#), and [14](#))
- Raschke, K. und Fellows, M. P.** (1971). Stomatal movement in *Zea mays*: Shuttle of potassium and chloride between guard cells and subsidiary cells. *Planta*, **101**:296–316. (Zitiert auf Seite [6](#))
- Rønne, C. und Keiding, S. R.** (2002). Low frequency spectroscopy of liquid water using THz-time domain spectroscopy. *J Mol Liq*, **101**:199–218. (Zitiert auf Seite [20](#))
- Sachs, T.** (1991). Cell polarity and tissue patterning in plants. *Development*, **113**:83–93. (Zitiert auf Seite [101](#))
- Sage, R. F.** (2017). A portrait of the C<sub>4</sub> photosynthetic family on the 50th anniversary of its discovery: species number, evolutionary lineages, and Hall of Fame. *J Exp Bot*, **68**:e11–e28. (Zitiert auf Seite [10](#))
- Sage, R. F. und Stata, M.** (2015). Photosynthetic diversity meets biodiversity: The C<sub>4</sub> plant example. *Plant Physiol*, **172**:104–119. (Zitiert auf Seite [9](#))
- Salvador-Recatalà, V., Tjallingii, W. F., und Farmer, E. E.** (2009). Real-time, *in vivo* intracellular recordings of caterpillar-induced depolarization waves in sieve elements using aphid electrodes. *New Phytol*, **203**:674–684. (Zitiert auf Seite [108](#))
- Sarmast, M. K., Salehi, H., und Khosh-Khui, M.** (2014). Seismomorphogenesis: a novel approach to acclimatization of tissue culture regenerated plants. *Biotech*, **4**:599–604. (Zitiert auf Seite [103](#))
- Scherzer, S., Shabala, L., Hedrich, B., Fromm, J., Bauer, H., Munz, E., Jacob, P., Al-Rascheid, K. A. S., Kreuzer, I., Becker, D., Eiblmeier, M., Rennenberg, H., Shabala, S., and E. Neher, M. B., und Hedrich, R.** (2017). Insect haptoelectrical stimulation of Venus flytrap triggers exocytosis in gland cells. *Proc Natl Acad Sci*, **114**:4822–4827. (Zitiert auf Seiten [17](#) and [102](#))
- Schmidt, O. und Roloff, A.** (2009). *Enzyklopädie der Holzgewächse: Acer pseudoplatanus*. Wiley VCH, 51 Edition. 1–26. (Zitiert auf Seite [14](#))

- Sedlmeier, P.** (1996). Jenseits des Signifikanztest-Rituals: Ergänzungen und Alternativen. MPR, 1:41–63. (Zitiert auf Seite 105)
- Shapiro, S. S.** und **Wilk, M. B.** (1965). An analysis of variance test for normality (complete samples). Biometrika, 52:591–611. (Zitiert auf Seite 48)
- Shi, N.** (2013). Cross section of maize, a C4 plant. Eigenes Werk. [https://de.m.wikipedia.org/wiki/Datei:Cross\\_section\\_of\\_maize,\\_a\\_C4\\_plant..jpg](https://de.m.wikipedia.org/wiki/Datei:Cross_section_of_maize,_a_C4_plant..jpg) Stand: 31.03.2019, 12:38 Uhr. (Zitiert auf Seite 6)
- Sibaoka, T.** (1969). Physiology of Rapid Movements in Higher Plants. Annu Rev Plant Phys, 20:165–184. (Zitiert auf Seite 15)
- Singh, R. J.** und **Hymowitz, T.** (1988). The genomic relationship between *Glycine max* (L.) Merr. and *G. soja* Sieb. and Zucc. as revealed by pachytene chromosome analysis. Theor Appl Genet, 76:705–711. (Zitiert auf Seite 15)
- Skoog, D. A.** und **Leary, J. J.** (1996). Instrumentelle Analytik. Springer Verlag, 1 Edition. (Zitiert auf Seite 46)
- Sorce, C., Giovannelli, A., Sebastiani, L.,** und **Anfodillo, T.** (2013). Hormonal signals involved in the regulation of cambial activity, xylogenesis and vessel patterning in trees. Plant Cell Rep, 32:885–898. (Zitiert auf Seite 101)
- Sorce, C., Mariotti, L., Lorenzi, R.,** und **Massai, R.** (2007). Hormonal factors involved in the control of vigour of grafted peach (*Prunus persica* (L.) Batsch) trees and hybrid rootstocks. Adv Horticult Sci, 21:68–74. (Zitiert auf Seite 101)
- Spalding, E. P.** (2000). Ion channels and the transduction of light signals. Plant Cell Environ, 23:665–674. (Zitiert auf Seite 17)
- Spanswick, R. M.** (1972). Electrical coupling between cells of higher plants: A direct demonstration of intercellular communication. Planta, 102:215–227. (Zitiert auf Seite 19)
- Spanswick, R. M.** und **Costerton, J. W. F.** (1967). Plasmodesmata in *Nitella translucens*: Structure and Electrical Resistance. J Cell sci, 2:451–464. (Zitiert auf Seiten 18 and 19)
- Stahlberg, R.** und **Cosgrove, D. J.** (1997). The propagation of slow wave potentials in pea epicotyls. Plant Physiol, 113:209–217. (Zitiert auf Seite 20)
- Stankovic, B., Witters, D. L., Zawadzki, T.,** und **Davies, E.** (1998). Action and variation potentials in sunflower: An analysis of their relationship and distinguishing characteristics. Physiol Plantarum, 103:51–58. (Zitiert auf Seiten 17, 19, 109, and 114)

- Stolarz, M.** und **Dziubinska, H.** (2017). Osmotic and Salt Stresses Modulate Spontaneous and Glutamate-Induced Action Potentials and Distinguish between Growth and Circumnutation in *Helianthus annuus* Seedlings. *Plant Sci*, **8**:1766. (Zitiert auf Seite 16)
- Stuehn, T.** (2016). Digitalkamera mit Autofokus und Live- Video-Vorschau. *ft:pedia*, **1**:69–78. (Zitiert auf Seite 41)
- Tardieu, F., Katerji, N., Bethenod, O., Zhang, J., und Davies, W. J.** (1991). Maize stomatal conductance in the field: its relationship with soil and plant water potentials, mechanical constraints and aba concentration in the xylem sap. *Plant Cell Environ*, **14**:121–126. (Zitiert auf Seite 110)
- Thellier, M., Sceller, L. L., Norris, V., Verdus, M.-C., und Ripoll, C.** (2000). Long-distance transport, storage and recall of morphogenetic information in plants. The existence of a sort of primitive plant „memory“. *Life Sci*, **323**:81–91. (Zitiert auf Seite 104)
- V44020001** (2009). Blattquerschnitt. Template: Escuela Europea Alicante. <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Blattquerschnitt.jpg> Stand: 31.03.2019, 12:25 Uhr. (Zitiert auf Seite 6)
- Vodeneev, V. A., Katicheva, L. A., und Sukhov, V. S.** (2016). Electrical signals in higher plants: Mechanisms of generation and propagation. *Biophysics*, **61**:505–512. (Zitiert auf Seiten 17, 110, and 113)
- Volkov, A. G., Wooten, J. D., Waite, A. J., Brown, C. R., und Markin, V. S.** (2011). Circadian rhythms in electrical circuits of *Clivia miniata*. *Plant Physiol*, **168**:1753–1760. (Zitiert auf Seite 12)
- Volkov, A. G., Wooten, J. D., Waite, A. J., Brown, C. R., und Markin, V. S.** (2012). Circadian rhythms in biologically closed electrical circuits of plants. *Plant Signal Behav*, **7**:282–284. (Zitiert auf Seite 12)
- Vuralhan, J.** (2015). Identifikation von regulatorischen Elementen des Glutamat:Glyoxylat Aminotransferase 1-Gens von *Arabidopsis thaliana*. Masterarbeit, Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover. (Zitiert auf Seite 47)
- Weiler, E. W. und Nover, L.** (2008). Allgemeine und molekulare Botanik. Thieme, **1** Edition. (Zitiert auf Seiten 7, 13, and 14)
- Wildon, D. C., Thain, J. F., Minchin, P. E. H., Gubb, I. R., Reilly, A. J., Skipper, Y. D., Doherty, H. M., O'Donnell, P. J., und Bowles, D. J.** (1992). Electrical signalling and systemic proteinase inhibitor induction in the wounded plant. *Nature*, **360**:62–65. (Zitiert auf Seiten 17 and 108)

- Xi, J.-J., Chen, H.-Y., Bai, W.-P., Yang, R.-C., Yang, P.-Z., Chen, R.-J., Hu, T.-M., und Wang, S.-M.** (2018). Sodium-Related Adaptations to Drought: New Insights From the Xerophyte Plant *Zygophyllum xanthoxylum*. *Plant Sci*, **9**:1678. (Zitiert auf Seite [115](#))
- Xiong, J. und Bauer, C. E.** (2002). Complex evolution of photosynthesis. *Annu Rev Plant Biol*, **53**:503–521. (Zitiert auf Seite [8](#))
- Yikrazuul** (2011). C4 photosynthesis NADP-ME. ISBN 978-0-8153-4121-5 p. 123, ISBN 978-90-481-9406-3, p. 201. [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:C4\\_photosynthesis\\_NADP-ME\\_type.svg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:C4_photosynthesis_NADP-ME_type.svg) Stand: 17.04.2019, 10:32 Uhr. (Zitiert auf Seiten [9](#) and [10](#))
- Zhu, J.-K.** (2002). Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annu Rev Plant Biol*, **53**:247–273. (Zitiert auf Seite [111](#))



# ANHANG A

---

## Anlagen

---

### A.1 Aus der Arbeit hervorgegangene Veröffentlichungen

Vuralhan-Eckert, J., Lautner, S. and Fromm, J. (2018) Effect of simultaneously induced environmental stimuli on electrical signalling and gas exchange in maize plants. *Journal of Plant Physiology*, 223: 32 – 36.

### A.2 Quellcode dynamischer Fokus bildgebende Einheit

Auskommentierte Bereiche des Quellcodes für den dynamischen Fokus sind jeweils mit # versehen.

**Listing A.1:** Dynamischer Fokus

```
#####  
#         ftDigiCam.py  
#         Digital Camera with live video stream to TXT display  
#         and autofocus functionality  
#         Initial Version (c) 2016 by Torsten Stuehn version 0.83  
#         from 2016-03-13  
#         Edit: (c) 2018 by Jasmin Vuralhan-Eckert  
#####  
  
# Python2/3 'print' compatibility  
from __future__ import print_function  
from collections import Counter  
  
import ftrobopy
```

```

import ftrobopytools
import os, sys
import time
import math
import threading
import threading
import SimpleHTTPServer
import SocketServer

# define simple webserver and provide direct access
# to pictures taken at: http://192.168.7.2:8085
class WebServer(threading.Thread):
    def __init__(self, document_root):
        self._document_root = document_root
        self._httpd_server = SocketServer.TCPServer(("", 8085),
            SimpleHTTPServer.SimpleHTTPRequestHandler)
        threading.Thread.__init__(self)
        return
    def __del__(self):
        self._httpd_server.server_close()
    def run(self):
        while True:
            currentDir=os.getcwd()
            os.chdir(self._document_root)
            self._httpd_server.handle_request()
            os.chdir(currentDir)
            time.sleep(0.5)

#----- Prozedur Initialisierung Motor nach Neustart -----
def initMotor(myRichtung,myMotor,myTrigger):

    myFocus_speed          = 512
    direction = myRichtung
    while not myTrigger.state() == 1:
        myMotor.setSpeed(myFocus_speed*direction)
        time.sleep(0.02)
        print("Motor laeuft noch; Taster: ", myTrigger.state())

```

```
myMotor.stop()
time.sleep(1.00)
#----- Ende Prozedur Initialisierung Motor nach Neustart -----

#-----Prozedur zur Bewegung der Motoren -----
def moveMotor(myRichtung, myMotor, myTrigger, myStrecke):

    myFocus_speed = 512
    myMotor.setDistance(myStrecke)
    print(myMotor.getCurrentDistance())
    if myRichtung == 1:
        myMotor.setSpeed(myFocus_speed*myRichtung)
        time.sleep(0.02)

        print(myTrigger.state())
        while not myTrigger.state() == 1:
            print("Motor laeuft noch", myMotor.getCurrentDistance())

    elif myRichtung == -1:
        print(myMotor.finished())
        myMotor.setSpeed(myFocus_speed*myRichtung)
        time.sleep(0.02)

        while not myMotor.finished():
            print("Motor laeuft noch", myMotor.getCurrentDistance())
            time.sleep(0.02)

    else:
        print("Alles andere")

    myMotor.stop()
    time.sleep(1.00)
#----- Ende Prozedur zur Bewegung der Motoren -----
```

```
# -----Prozedur mache Bild -----
def makePicture(myVidev,myDisplayLiveStream,myFocusMotor,myTrigger,
myPicture_dir):

    # define the directory where the pictures should be stored
    # if you want to store pictures at external SD card, set this to
    # e.g. '/mnt'
    #picture_dir      = '/opt/knobloch/ftrobopy/PICTURES'
    picture_dir      = '/mnt/ft '
    # override directory if it was given as command line argument
    if len(sys.argv) > 1:
        picture_dir = sys.argv[1]

    # define the prefix of the picture-filename
    fname_prefix     = 'PIC'

    # define minimum and maximum size of list for contrast search
    hist_minlength   = 5
    hist_maxlength   = 50
    minState0 = 10
    minState1 = 10
    minState2 = 16
    minState3 = 12
    minState4 = 20
    durchlauf = 0

    # initialize camera (/dev/video0)
    fps      = 15 # frames per second
    width    = 320 # width of camera image
    height   = 240 # height of camera image
    #videv   = ftrobopytools.camInit(fps, width, height, 0, 0)

    #if displayLiveStream:
        # initialize Standard Display Library (SDL)
    # ftrobopytools.sdlInit()
        # reset text/cmd console (compromized by SDL)
    # os.system('reset')
```

```
#time.sleep(0.02)

myFocus_speed      = 512

contrast           = 0
hist_contrast_hlp  = []
hist_contrast      = []
hist_contrast_A    = []
hist_contrast_B    = []
hist_counter       = [0]
ave_contrast       = 0
counter_hist_shift = 2

# choose rectangular region for contrast measurement
xtopleft   = 120
ytopleft   = 90
xbottomright = 180
ybottomright = 150
state      = 0
direction  = 1
myHistMaxGesamt = 0

for i in range(1000):
    contrast = ftrobopytools.measureContrast(myVidev,
                                              width, height,
                                              xtopleft, ytopleft, xbottomright,
ybottomright, myDisplayLiveStream)

    # if camera picture was invalid use last values
    if contrast == None:
        #contrast = hist_contrast[-1]
        contrast = 0
    else:
        contrast = int(math.sqrt(contrast)*2+0.5)
        #print("aktuell gemessener Wert:", contrast)
```

```
#if contrast >= 25 and state > 0:
# myFocusMotor.stop()
# time.sleep(0.02)
# myFocus_speed          = 128
# myFocusMotor.setDistance(100)
# myFocusMotor.setSpeed(myFocus_speed*direction)

#elif state > 0:
# myFocusMotor.stop()
# time.sleep(0.02)
# myFocus_speed          = 256
# myFocusMotor.setDistance(100)
# myFocusMotor.setSpeed(myFocus_speed*direction)

# Abweichung der Messwert nur um Wert = PlusMinus 3 akzeptiert.
# Alles Andere wird nicht akzeptiert
if state > 0 and state < 3 and ((hist_contrast[-1] +3) >= contrast)
    and ((hist_contrast[-1] -3) <= contrast) and contrast > 0:
    hist_contrast.append(contrast)
elif state >= 3 and state < 6 and ((hist_contrast[-1] +15)
    >= contrast) and ((hist_contrast[-1] -15) <= contrast)
    and contrast > 0: hist_contrast.append(contrast)
elif state >= 6 and ((hist_contrast[-1] +25) >= contrast)
    and ((hist_contrast[-1] -25) <= contrast)
    and contrast > 0: hist_contrast.append(contrast)
# Erste Messung Append
elif (len(hist_contrast) < minState0 and state == 0
    and contrast >= 1): hist_contrast.append(contrast)

# print state and contrast list for debugging
# uncomment the next line to see what is going on
print("state:", state, hist_contrast)

#wenn mehr als x dann ersten abschneiden
if len(hist_contrast) > hist_maxlength:
    hist_contrast = hist_contrast[1:]
```

```
# Ermittlung von MAX / Min Kontrast
max_contrast      = max(hist_contrast)
min_contrast      = min(hist_contrast)

# Erster Durchlauf Min == Max
if min_contrast == max_contrast:
    contrast_variation = 0
else:
    contrast_variation = 1

# Erster Durchlauf mit State 0
# Zweiter Durchlauf aus State 1 -> Fahre nach Links
if state == 0 and len(hist_contrast) >= minState0:

    #hist_contrast = [max_contrast]

#Algorithmus zur Ermittlung des hauefigsten Elementes in der Startliste
bestesElement = 0
besteAnzahl = 0
for j in hist_contrast:
    if hist_contrast.count(j) > besteAnzahl:
        bestesElement = j
        besteAnzahl = hist_contrast.count(j)
hist_contrast = [bestesElement]
print("Bestes Elem", bestesElement)

#Wenn erste Werte bereits ueber 20 sind,
#dann direkt in State 6 mit langsamen Motor
if bestesElement >= 20:
    time.sleep(0.02)
    myFocusMotor.setDistance(100)
    myFocus_speed = 128
    myFocusMotor.setSpeed(myFocus_speed*direction)
    state = 6
    print("Springe aus State 0 in State 6")
#Andernfalls, wenn Werte unter 20, dann normal Fokussuche
```

```

else:
    time.sleep(0.02)
    myFocusMotor.setDistance(100)
    myFocusMotor.setSpeed(myFocus_speed*direction)
    state = 1

if state == 1:
    # Richtige Richtung
    if durchlauf == 0 and len(hist_contrast) >= minState1
    and (hist_contrast[-10] + hist_contrast[-9] + hist_contrast[-8] +
    hist_contrast[-7] + hist_contrast[-6]) < (hist_contrast[-1]
+ hist_contrast[-2] + hist_contrast[-3] + hist_contrast[-4]
+ hist_contrast[-5]): state = 2
    # Richtungswechsel
    elif durchlauf == 0 and len(hist_contrast) >= minState1 and
    (hist_contrast[-10] + hist_contrast[-9] + hist_contrast[-8] +
    hist_contrast[-7] + hist_contrast[-6]) > (hist_contrast[-1]
+ hist_contrast[-2] + hist_contrast[-3] + hist_contrast[-4]
+ hist_contrast[-5]):
        myFocusMotor.stop()
        time.sleep(0.02)
        direction = -direction
        print("Wechsel Richtung State 1")
        hist_contrast = hist_contrast[0:4]
        myFocusMotor.setDistance(100)
        myFocusMotor.setSpeed(myFocus_speed*direction)
        durchlauf = 1
    # Wenn Richtungswechsel bereits passiert ist, verhindern von
    Endlosschleife
    elif durchlauf == 1 and len(hist_contrast) >= 15
    and (hist_contrast[-10] +
    hist_contrast[-9] +
    hist_contrast[-8] + hist_contrast[-7]
    + hist_contrast[-6]) <=
    (hist_contrast[-1] +
    hist_contrast[-2] + hist_contrast[-3] +
    hist_contrast[-4] + hist_contrast[-5]):

```



```
hist_contrast_A = hist_contrast [0:4]
hist_contrast_B = hist_contrast [-5:-1]
hist_contrast = hist_contrast_A + hist_contrast_B
durchlauf = 0
state = 2

if state == 2:
    # Richtige Richtung
    if len(hist_contrast) >= minState2 and (hist_contrast[-6] +
        hist_contrast[-5]
+ hist_contrast[-4]) < (hist_contrast[-3] + hist_contrast[-2]
        + hist_contrast[-1]):
        #hist_contrast = [0]
        #hist_counter = [0]
        hist_contrast = hist_contrast[-6:-1]
        hist_counter = hist_counter[-6:-1]
        myFocusMotor.stop()
        time.sleep(0.02)
        myFocusMotor.setDistance(100)
        myFocus_speed = 128
        myFocusMotor.setSpeed(myFocus_speed*direction)
        state = 3
    # Doch falsche Richtung
    elif len(hist_contrast) >= minState2 and (hist_contrast[-6]
        + hist_contrast[-5]
+ hist_contrast[-4]) > (hist_contrast[-3] + hist_contrast[-2]
        + hist_contrast[-1]):
        myFocusMotor.stop()
        time.sleep(0.02)
        #Richtungswechsel
        print("Wechsel Richtung State 2")
        direction = -direction
        #Behalte Werte wie aus State 1 zu Beginn
        hist_contrast = hist_contrast[0:9]
        hist_counter = hist_counter[0:9]
        myFocusMotor.setDistance(100)
```

```

myFocusMotor.setSpeed(myFocus_speed*direction)

#Spezialstate bei bereits guten Werten aus State 0 ->
Richtungspfindung
if state == 6:
    # Richtige Richtung
    if len(hist_contrast) >= minState2 and (hist_contrast[-6] +
hist_contrast[-5] + hist_contrast[-4])
< (hist_contrast[-3] + hist_contrast[-2] + hist_contrast[-1]):
        #hist_contrast = [0]
        #hist_counter = [0]
        hist_contrast = hist_contrast[-6:-1]
        hist_counter = hist_counter[-6:-1]
        myFocusMotor.stop()
        time.sleep(0.02)
        myFocusMotor.setDistance(100)
        myFocus_speed = 128
        myFocusMotor.setSpeed(myFocus_speed*direction)
        state = 3
# Doch falsche Richtung
elif len(hist_contrast) >= minState2 and (hist_contrast[-6]
+ hist_contrast[-5]
+ hist_contrast[-4])
    >= (hist_contrast[-3] + hist_contrast[-2]
+ hist_contrast[-1]):
        myFocusMotor.stop()
        time.sleep(0.02)
        #Richtungswechsel
        direction = -direction
        #Behalte Werte wie aus State 1 zu Beginn
        hist_contrast = hist_contrast[0:9]
        hist_counter = hist_counter[0:9]
        myFocusMotor.setDistance(100)
        myFocusMotor.setSpeed(myFocus_speed*direction)

# Richtige Richtung ist gewaehlt -> Scheitelpunkt erreicht und
# Kontrast wird wieder schlechter?

```

```

if state == 3:
    myHistMaxGesamt = max(hist_contrast)
    # Scheitelpunkt ueberschritten , Werte werden wieder kleiner
    if myHistMaxGesamt >= 25 and len(hist_contrast)
        >= minState3 and (hist_contrast[-6]
            + hist_contrast[-5]
            + hist_contrast[-4]) > (hist_contrast[-3] +
                hist_contrast[-2] + hist_contrast[-1]):
        myFocusMotor.stop()
        time.sleep(0.02)
        print("Wechsel Richtung State 3 Scheitelpunkt ueberschritten
            -> State 4")
        direction = -direction
        myFocusMotor.setDistance(100)
        myFocusMotor.setSpeed(myFocus_speed*direction)
        state = 4

# Fehlerabfangen
elif len(hist_contrast) >= 50 and hist_contrast[-1]
    <= 8 and (hist_contrast[-6] + hist_contrast[-5] +
        hist_contrast[-4]) > (hist_contrast[-3] + hist_contrast[-2] +
            hist_contrast[-1]):
    print("Ruecksprung aus State 3 in State 1")
    myFocus_speed = 512
    time.sleep(0.02)
    myFocusMotor.setDistance(100)
    myFocusMotor.setSpeed(myFocus_speed*direction)
    state = 1

# Scheitelpunkt IST ueberschritten , drehe zurueck bis MAX
if state == 4:
    #if len(hist_contrast) > hist_minlength and ( (hist_contrast[-1]
<= hist_contrast[-2]) and (hist_contrast[-2] < hist_contrast[-3]) and
(hist_contrast[-3] < hist_contrast[-4]) or contrast_variation == 0 ):
        #if (hist_contrast[-1] == myHistMaxGesamt or (myHistMaxGesamt +
7 >= hist_contrast[-1]

```

```

and myHistMaxGesamt - 7 <= hist_contrast[-1]):
    if (hist_contrast[-1] == myHistMaxGesamt or (myHistMaxGesamt +
5 >= hist_contrast[-1]
and myHistMaxGesamt - 5 <= hist_contrast[-1])):
    myFocusMotor.stop()
    time.sleep(0.02)
    print("Bild bei Kontrastwert: ", hist_contrast[-1])

    # start increasing focus to maximum contrast
    #idx = hist_contrast.index(max(hist_contrast))
    # counter_hist_shift takes care of lag shift between camera pics
and motor counter
    #bestfocus_counter = hist_counter[idx-counter_hist_shift]
    #myFocusMotor.setDistance(abs(hist_counter[-1]-bestfocus_counter)
    #myFocusMotor.setSpeed(myFocus_speed*direction)
    #time.sleep(0.02)
    #print("SetDistance: ",abs(hist_counter[-1]-bestfocus_counter))
    state = 5
    elif (len(hist_contrast) >= minState4 and (hist_contrast[-6] +
hist_contrast[-5] +
hist_contrast[-4]) >=(hist_contrast[-3] +
hist_contrast[-2] + hist_contrast[-1])) :
    myFocusMotor.stop()
    time.sleep(0.02)
    #Richtungswechsel
    direction = -direction
    #Behalte Werte wie aus State 1 zu Beginn
    hist_contrast = hist_contrast[-6:-1]
    hist_counter = hist_counter[-6:-1]
    myFocusMotor.setDistance(100)
    myFocusMotor.setSpeed(myFocus_speed*direction)
    state = 3

if state == 5:
    # save jpeg in high resolution (1280x720)
    # close (low resolution) camera device

```

```
ftrobopytools.camClose(videv, 0)
# open (high resolution) camera device
high_fps      = 5    # 5 is the lowest
possible framerate of the TXT camera
high_width    = 1280 # 1280 is the
maximum horizontal resolution of the TXT camera
high_height   = 720  # 720 is the maximum
vertical resolution of the TXT camera
myVidev = ftrobopytools.camInit(high_fps, high_width,
high_height, 0, 0)
# get high resolution snapshot as jpg image
jpg      = ftrobopytools.getJPEGImage(videv)
# close (high resolution) camera device
ftrobopytools.camClose(videv, 0)
# restore resolution for liveStreaming
myVidev = ftrobopytools.camInit(fps, width, height, 0, 0)
# save jpeg to file and increment picture count index
try:
    with open(myPicture_dir+'/' + fname_prefix+'IDX', 'r') as f:
        pict_number = int(f.read())
except:
    pict_number = 0
with open(myPicture_dir+'/' + fname_prefix + '%04i '
        % pict_number + '.JPG', 'wb') as f:
    f.write(jpg)
with open(myPicture_dir+'/' + fname_prefix+'IDX', 'w') as f:
    f.write(str(pict_number + 1))
# ready for the next picture
hist_contrast = [0]
hist_counter  = [0]
state = 0
break
```

```
#————— Ende Prozedur mache Bild —————
```

```
#----- Anfang Hauptprogramm -----  
  
startWebServer = True  
  
# initialize socket connection to TXT-Main  
txt = ftrobopy.ftrobopy('127.0.0.1', 65000)  
  
# define the speed of the focus motor  
# (max:512, min:100, the slower the speed the better the focus)  
#focus_speed      = 512  
  
picture_dir        = '/mnt/ft '  
  
# if set to 0, no live video is shown on TXT Display  
displayLiveStream = 1 # live video on TXT display, 0=no 1=yes  
  
# definition of TXT outputs and inputs  
  
XMotor      = txt.motor(1)  
XTrigger    = txt.input(1)  
YMotor      = txt.motor(2)  
YTrigger    = txt.input(2)  
ZMotor      = txt.motor(3)  
ZTrigger    = txt.input(3)  
FocusMotor  = txt.motor(4) # the focus motor is connected to M4  
Trigger     = txt.input(4) # the camera trigger with auto focus  
              is connected to I4  
#FocusMotor  = txt.motor(1) # the focus motor is connected to M1  
#Trigger     = txt.input(1) # the camera trigger with auto focus  
              is connected to I1  
  
if startWebServer:  
    httpd_thread = WebServer(picture_dir)  
    httpd_thread.setDaemon(True)
```

```
    httpd_thread.start()

if displayLiveStream:
    # make backup copy of TXT display contents
    with open('/dev/fb0', 'rb') as f:
        framebuffer_backup=f.read()

#cleanup()

try:

    # initialize camera (/dev/video0)
    fps    = 15 # frames per second
    width  = 320 # width of camera image
    height = 240 # height of camera image
    videv  = ftrobopytools.camInit(fps, width, height, 0, 0)

    if displayLiveStream:
        # initialize Standard Display Library (SDL)
        ftrobopytools.sdlInit()
        # reset text/cmd console (compromized by SDL)
        os.system('reset ')

    print(XMotor.getCurrentDistance())

    initMotor(1,XMotor,XTrigger)
    #initMotor(1,ZMotor,ZTrigger)

    #moveMotor(-1,ZMotor,ZTrigger,1500)
    #moveMotor(-1,XMotor,XTrigger,1800)

    for i in range(10):

        moveMotor(-1,XMotor,XTrigger,230)
```

```
    time.sleep(0.1)
##    makePicture(videv, displayLiveStream, FocusMotor, Trigger, picture_dir)
##    time.sleep(0.5)

    moveMotor(-1, XMotor, XTrigger, 225)
    time.sleep(0.1)
##    makePicture(videv, displayLiveStream, FocusMotor, Trigger, picture_dir)
##    time.sleep(0.5)

    moveMotor(-1, XMotor, XTrigger, 225)
    time.sleep(0.1)
##    makePicture(videv, displayLiveStream, FocusMotor, Trigger, picture_dir)
##    time.sleep(0.5)

    moveMotor(-1, XMotor, XTrigger, 100)
    time.sleep(0.1)
    makePicture(videv, displayLiveStream, FocusMotor, Trigger, picture_dir)
    time.sleep(0.5)

    moveMotor(-1, XMotor, XTrigger, 250)
    time.sleep(0.1)
    makePicture(videv, displayLiveStream, FocusMotor, Trigger, picture_dir)
    time.sleep(0.5)

    moveMotor(-1, XMotor, XTrigger, 300)
    time.sleep(0.1)
    makePicture(videv, displayLiveStream, FocusMotor, Trigger, picture_dir)
    time.sleep(0.5)
##
##    moveMotor(-1, XMotor, XTrigger, 175)
##    time.sleep(0.1)
##    makePicture(videv, displayLiveStream, FocusMotor, Trigger, picture_dir)
##    time.sleep(0.5)
##
##    moveMotor(-1, XMotor, XTrigger, 235)
##    time.sleep(0.1)
```



```

##      makePicture(videv , displayLiveStream , FocusMotor , Trigger , picture_dir)
##      time.sleep(0.5)
##
##      moveMotor(-1,XMotor , XTrigger ,257)
##      time.sleep(0.1)
##      makePicture(videv , displayLiveStream , FocusMotor , Trigger , picture_dir)
##      time.sleep(0.5)

# Auf Ausgang zurueck
initMotor(1,XMotor , XTrigger)

except ftrobopytools as error:
    print(error)

finally:
    # close camera device
    ftrobopytools.camClose(videv , 0)
    txt.stopOnline()
    time.sleep(0.1)
    if displayLiveStream:
        # close Standard Display Library
        ftrobopytools.sdlClose()
        # restore TXT display
        with open('/dev/fb0 ', 'wb') as f:
            f.write(framebuffer_backup)

```

### A.3 Quellcode verändert für statischen Fokus bildgebende Einheit

Auskommentierte Bereiche des Quellcodes für den statischen Fokus sind jeweils mit # versehen.

**Listing A.2:** Statischer Fokus

```

#####
#      ftDigiCam.py
#      Digital Camera with live video stream to TXT display
#      and autofocus functionality
#      Initial Version (c) 2016 by Torsten Stuehn version 0.83 from

```

```
#                2016-03-13
#                Edit: (c) 2018 by Jasmin Vuralhan-Eckert
#####

# Python2/3 'print' compatibility
from __future__ import print_function
from collections import Counter

import ftrobopy
import ftrobopytools
import os, sys
import time
import math
import threading
import threading
import SimpleHTTPServer
import SocketServer

# define simple webserver and provide direct access
# to pictures taken at: http://192.168.7.2:8085
class WebServer(threading.Thread):
    def __init__(self, document_root):
        self._document_root = document_root
        self._httpd_server = SocketServer.TCPServer(("", 8085),
SimpleHTTPServer.SimpleHTTPRequestHandler)
        threading.Thread.__init__(self)
        return
    def __del__(self):
        self._httpd_server.server_close()
    def run(self):
        while True:
            currentDir=os.getcwd()
            os.chdir(self._document_root)
            self._httpd_server.handle_request()
            os.chdir(currentDir)
            time.sleep(0.5)
```

```
#----- Prozedur Initialisierung Motor nach Neustart -----  
def initMotor(myRichtung, myMotor, myTrigger):  
  
    myFocus_speed      = 512  
    direction = myRichtung  
    while not myTrigger.state() == 1:  
        myMotor.setSpeed(myFocus_speed*direction)  
        time.sleep(0.02)  
        print("Motor laeuft noch; Taster: ", myTrigger.state())  
  
    myMotor.stop()  
    time.sleep(1.00)  
#----- Ende Prozedur Initialisierung Motor nach Neustart -----
```

```
#-----Prozedur zur Bewegung der Motoren -----  
def moveMotor(myRichtung, myMotor, myTrigger, myStrecke):  
  
    myFocus_speed      = 512  
    myMotor.setDistance(myStrecke)  
    print(myMotor.getCurrentDistance())  
    if myRichtung == 1:  
        myMotor.setSpeed(myFocus_speed*myRichtung)  
        time.sleep(0.02)  
  
        print(myTrigger.state())  
        while not myTrigger.state() == 1:  
            print("Motor laeuft noch", myMotor.getCurrentDistance())  
  
    elif myRichtung == -1:  
        print(myMotor.finished())  
        myMotor.setSpeed(myFocus_speed*myRichtung)  
        time.sleep(0.02)  
  
        while not myMotor.finished():  
            print("Motor laeuft noch", myMotor.getCurrentDistance())
```

```

        time.sleep(0.02)

    else:
        print("Alles andere")

    myMotor.stop()
    time.sleep(1.00)
#----- Ende Prozedur zur Bewegung der Motoren -----

#-----Prozedur mache Bild -----
def makePicture(myVidev, myDisplayLiveStream, myFocusMotor, myTrigger,
myPicture_dir):

    # define the directory where the pictures should be stored
    # if you want to store pictures at external SD card, set this to
    #e.g. '/mnt'
    #picture_dir      = '/opt/knobloch/ftrobopy/PICTURES'
    picture_dir      = '/mnt/ft'
    # override directory if it was given as command line argument
    if len(sys.argv) > 1:
        picture_dir = sys.argv[1]

    # define the prefix of the picture-filename
    fname_prefix     = 'PIC'

    # define minimum and maximum size of list for contrast search
    hist_minlength   = 5
    hist_maxlength   = 50
    minState0 = 10
    minState1 = 10
    minState2 = 16
    minState3 = 12
    minState4 = 20
    durchlauf = 0

    # initialize camera (/dev/video0)
    fps      = 15 # frames per second

```



```

xbottomright , myDisplayLiveStream)

# if camera picture was invalid use last values
if contrast == None:
    #contrast = hist_contrast[-1]
    contrast = 0
else:
    contrast = int(math.sqrt(contrast)*2+0.5)
    #print(" aktuell gemessener Wert:", contrast)
    #if contrast >= 25 and state > 0:
    # myFocusMotor.stop()
    # time.sleep(0.02)
    # myFocus_speed          = 128
    # myFocusMotor.setDistance(100)
    # myFocusMotor.setSpeed(myFocus_speed*direction)

    #elif state > 0:
    # myFocusMotor.stop()
    # time.sleep(0.02)
    # myFocus_speed          = 256
    # myFocusMotor.setDistance(100)
    # myFocusMotor.setSpeed(myFocus_speed*direction)

# Abweichung der Messwert nur um Wert = PlusMinus 3 akzeptiert.
# Alles Andere wird nicht akzeptiert
if state > 0 and state < 3 and ((hist_contrast[-1] + 3) >= contrast)
and ((hist_contrast[-1] -3) <= contrast) and contrast > 0:
    hist_contrast.append(contrast)
    elif state >= 3 and state < 6 and ((hist_contrast[-1] + 15)
>= contrast) and ((hist_contrast[-1] -15) <= contrast) and contrast > 0:
    hist_contrast.append(contrast)
    elif state >= 6 and ((hist_contrast[-1] + 25) >= contrast) and
((hist_contrast[-1] -25) <= contrast) and contrast > 0:
    hist_contrast.append(contrast)
# Erste Messung Append
elif (len(hist_contrast) < minState0 and state == 0 and
contrast >= 1):

```

```
hist_contrast.append(contrast)

# print state and contrast list for debugging
# uncomment the next line to see what is going on
print("state:", state, hist_contrast)

#wenn mehr als x dann ersten abschneiden
if len(hist_contrast) > hist_maxlength:
    hist_contrast = hist_contrast[1:]

# Ermittlung von MAX / Min Kontrast
max_contrast      = max(hist_contrast)
min_contrast      = min(hist_contrast)

# Erster Durchlauf Min == Max
if min_contrast == max_contrast:
    contrast_variation = 0
else:
    contrast_variation = 1

# Erster Durchlauf mit State 0
# Zweiter Durchlauf aus State 1 -> Fahre nach Links
if state == 0 and len(hist_contrast) >= minState0:

    #hist_contrast = [max_contrast]

#Algorithmus zur Ermittlung des hauefigsten Elementes in der Startliste
bestesElement = 0
besteAnzahl = 0
for j in hist_contrast:
    if hist_contrast.count(j) > besteAnzahl:
        bestesElement = j
        besteAnzahl = hist_contrast.count(j)
hist_contrast = [bestesElement]
print("Bestes Elem", bestesElement)
```

```

#Wenn erste Werte bereits ueber 20 sind , dann direkt in State 6 mit
    langsamen Motor
if bestesElement >= 20:
    time.sleep(0.02)
##        myFocusMotor.setDistance(100)
##        myFocus_speed = 128
##        myFocusMotor.setSpeed(myFocus_speed*direction)
    #state = 6
    state = 5
    print("Springe aus State 0 in State 6")
#Andernfalls , wenn Werte unter 20, dann normal Fokussuche
else:
    time.sleep(0.02)
##        myFocusMotor.setDistance(100)
##        myFocusMotor.setSpeed(myFocus_speed*direction)
    #state = 1
    state = 5

if state == 1:
    # Richtige Richtung
    if durchlauf == 0 and len(hist_contrast) >= minState1 and
(hist_contrast[-10] + hist_contrast[-9] + hist_contrast[-8] +
hist_contrast[-7] + hist_contrast[-6]) < (hist_contrast[-1] +
hist_contrast[-2] + hist_contrast[-3] + hist_contrast[-4] +
hist_contrast[-5]):
        state = 2
    # Richtungswechsel
    elif durchlauf == 0 and len(hist_contrast) >= minState1
and (hist_contrast[-10] + hist_contrast[-9] + hist_contrast[-8] +
hist_contrast[-7] + hist_contrast[-6]) > (hist_contrast[-1] +
hist_contrast[-2] + hist_contrast[-3] + hist_contrast[-4] +
hist_contrast[-5]):
        myFocusMotor.stop()
        time.sleep(0.02)
        direction = -direction
        print("Wechsel Richtung State 1")
        hist_contrast = hist_contrast[0:4]

```



```
myFocusMotor.setDistance(100)
myFocusMotor.setSpeed(myFocus_speed*direction)
durchlauf = 1
# Wenn Richtungswechsel bereits passiert ist, verhindern
von Endlosschleife
    elif durchlauf == 1 and len(hist_contrast) >= 15
and (hist_contrast[-10] + hist_contrast[-9] + hist_contrast[-8] +
hist_contrast[-7] + hist_contrast[-6]) <= (hist_contrast[-1] +
hist_contrast[-2] + hist_contrast[-3] + hist_contrast[-4] +
hist_contrast[-5]):
    hist_contrast_A = hist_contrast[0:4]
    hist_contrast_B = hist_contrast[-5:-1]
    hist_contrast = hist_contrast_A + hist_contrast_B
    durchlauf = 0
    state = 2

if state == 2:
    # Richtige Richtung
    if len(hist_contrast) >= minState2 and (hist_contrast[-6] +
hist_contrast[-5] + hist_contrast[-4]) < (hist_contrast[-3] +
hist_contrast[-2] + hist_contrast[-1]):
        #hist_contrast = [0]
        #hist_counter = [0]
        hist_contrast = hist_contrast[-6:-1]
        hist_counter = hist_counter[-6:-1]
        myFocusMotor.stop()
        time.sleep(0.02)
        myFocusMotor.setDistance(100)
        myFocus_speed = 128
        myFocusMotor.setSpeed(myFocus_speed*direction)
        state = 3
    # Doch falsche Richtung
    elif len(hist_contrast) >= minState2 and (hist_contrast[-6] +
hist_contrast[-5] + hist_contrast[-4]) > (hist_contrast[-3] +
hist_contrast[-2] + hist_contrast[-1]):
        myFocusMotor.stop()
```

```

    time.sleep(0.02)
    #Richtungswechsel
    print("Wechsel Richtung State 2")
    direction = -direction
    #Behalte Werte wie aus State 1 zu Beginn
    hist_contrast = hist_contrast[0:9]
    hist_counter = hist_counter[0:9]
    myFocusMotor.setDistance(100)
    myFocusMotor.setSpeed(myFocus_speed*direction)

#Spezialstate bei bereits guten Werten aus State 0 ->
Richtungspfindung
    if state == 6:
        # Richtige Richtung
        if len(hist_contrast) >= minState2 and (hist_contrast[-6]
+ hist_contrast[-5] + hist_contrast[-4]) < (hist_contrast[-3] +
    hist_contrast[-2] + hist_contrast[-1]):
            #hist_contrast = [0]
            #hist_counter = [0]
            hist_contrast = hist_contrast[-6:-1]
            hist_counter = hist_counter[-6:-1]
            myFocusMotor.stop()
            time.sleep(0.02)
            myFocusMotor.setDistance(100)
            myFocus_speed = 128
            myFocusMotor.setSpeed(myFocus_speed*direction)
            state = 3
        # Doch falsche Richtung
        elif len(hist_contrast) >= minState2 and (hist_contrast[-6]
+ hist_contrast[-5] + hist_contrast[-4]) >= (hist_contrast[-3] +
    hist_contrast[-2] + hist_contrast[-1]):
            myFocusMotor.stop()
            time.sleep(0.02)
            #Richtungswechsel
            direction = -direction
            #Behalte Werte wie aus State 1 zu Beginn
            hist_contrast = hist_contrast[0:9]

```

```

hist_counter = hist_counter[0:9]
myFocusMotor.setDistance(100)
myFocusMotor.setSpeed(myFocus_speed*direction)

# Richtige Richtung ist gewaehlt -> Scheitelpunkt erreicht und
Kontrast wird wieder schlechter?
if state == 3:
    myHistMaxGesamt = max(hist_contrast)
    # Scheitelpunkt ueberschritten, Werte werden wieder kleiner
    if myHistMaxGesamt >= 25 and len(hist_contrast) >= minState3
and (hist_contrast[-6] + hist_contrast[-5] + hist_contrast[-4]) >
(hist_contrast[-3] + hist_contrast[-2] + hist_contrast[-1]):
        myFocusMotor.stop()
        time.sleep(0.02)
        print("Wechsel Richtung State 3 Scheitelpunkt ueberschritten
-> State 4")
        direction = -direction
        myFocusMotor.setDistance(100)
        myFocusMotor.setSpeed(myFocus_speed*direction)
        state = 4

# Fehlerabfangen
elif len(hist_contrast) >= 50 and hist_contrast[-1] <= 8
and (hist_contrast[-6] + hist_contrast[-5] + hist_contrast[-4])
> (hist_contrast[-3] + hist_contrast[-2] + hist_contrast[-1]):
    print("Ruecksprung aus State 3 in State 1")
    myFocus_speed = 512
    time.sleep(0.02)
    myFocusMotor.setDistance(100)
    myFocusMotor.setSpeed(myFocus_speed*direction)
    state = 1

# Scheitelpunkt IST ueberschritten, drehe zurueck bis MAX
if state == 4:
    #if len(hist_contrast) > hist_minlength and ( (hist_contrast[-1]
<= hist_contrast[-2]) and (hist_contrast[-2] < hist_contrast[-3]) and

```

```

(hist_contrast[-3] < hist_contrast[-4]) or contrast_variation == 0 ):
    #if (hist_contrast[-1] == myHistMaxGesamt or (myHistMaxGesamt +
7 >= hist_contrast[-1] and myHistMaxGesamt - 7 <= hist_contrast[-1])):
    if (hist_contrast[-1] == myHistMaxGesamt or (myHistMaxGesamt +
5 >= hist_contrast[-1] and myHistMaxGesamt - 5 <= hist_contrast[-1])):
        myFocusMotor.stop()
        time.sleep(0.02)
        print("Bild bei Kontrastwert: ", hist_contrast[-1])

        # start increasing focus to maximum contrast
        #idx = hist_contrast.index(max(hist_contrast))
        # counter_hist_shift takes care of lag shift between camera
pics and motor counter
        #bestfocus_counter = hist_counter[idx-counter_hist_shift]
        #myFocusMotor.setDistance(abs(hist_counter[-1]-
bestfocus_counter))
        #myFocusMotor.setSpeed(myFocus_speed*direction)
        #time.sleep(0.02)
        #print("SetDistance: ",abs(hist_counter[-1]-bestfocus_counter))
        state = 5
    elif (len(hist_contrast) >= minState4 and (hist_contrast[-6] +
hist_contrast[-5] + hist_contrast[-4]) >= (hist_contrast[-3] +
hist_contrast[-2] + hist_contrast[-1])) :
        myFocusMotor.stop()
        time.sleep(0.02)
        #Richtungswechsel
        direction = -direction
        #Behalte Werte wie aus State 1 zu Beginn
        hist_contrast = hist_contrast[-6:-1]
        hist_counter = hist_counter[-6:-1]
        myFocusMotor.setDistance(100)
        myFocusMotor.setSpeed(myFocus_speed*direction)
        state = 3

if state == 5:
    # save jpeg in high resolution (1280x720)

```

```
# close (low resolution) camera device
ftrobopytools.camClose(viddev, 0)
# open (high resolution) camera device
high_fps      = 5
# 5 is the lowest possible framerate of the TXT
camera
    high_width  = 1280
# 1280 is the maximum horizontal resolution of
the TXT camera
    high_height = 720
# 720 is the maximum vertical resolution of
the TXT camera
    myViddev = ftrobopytools.camInit(high_fps, high_width,
high_height, 0, 0)
# get high resolution snapshot as jpg image
jpg  = ftrobopytools.getJPEGImage(viddev)
# close (high resolution) camera device
ftrobopytools.camClose(viddev, 0)
# restore resolution for liveStreaming
myViddev = ftrobopytools.camInit(fps, width, height, 0, 0)
# save jpeg to file and increment picture count index
try:
    with open(myPicture_dir+'/' + fname_prefix+'IDX', 'r') as f:
        pict_number = int(f.read())
except:
    pict_number = 0
with open(myPicture_dir+'/' + fname_prefix + '
%04i' % pict_number + '.JPG', 'wb') as f:
    f.write(jpg)
with open(myPicture_dir+'/' + fname_prefix+'IDX', 'w') as f:
    f.write(str(pict_number + 1))
# ready for the next picture
hist_contrast = [0]
hist_counter  = [0]
state = 0
break
```

```
#----- Ende Prozedur mache Bild -----  
  
#----- Anfang Hauptprogramm -----  
  
startWebServer = True  
  
# initialize socket connection to TXT-Main  
txt = ftrobopy.ftrobopy('127.0.0.1', 65000)  
  
# define the speed of the focus motor  
# (max:512, min:100, the slower the speed the better the focus)  
#focus_speed      = 512  
  
picture_dir        = '/mnt/ft '  
  
# if set to 0, no live video is shown on TXT Display  
displayLiveStream = 1 # live video on TXT display, 0=no 1=yes  
  
# definition of TXT outputs and inputs  
  
XMotor      = txt.motor(1)  
XTrigger    = txt.input(1)  
YMotor      = txt.motor(2)  
YTrigger    = txt.input(2)  
ZMotor      = txt.motor(3)  
ZTrigger    = txt.input(3)  
FocusMotor  = txt.motor(4)  
# the focus motor is connected to M4  
Trigger     = txt.input(4)  
# the camera trigger with auto focus is connected to I4  
#FocusMotor = txt.motor(1) # the focus motor is connected  
# to M1  
#Trigger    = txt.input(1)
```

```
# the camera trigger with auto focus is connected to I1

if startWebServer:
    httpd_thread = WebServer(picture_dir)
    httpd_thread.setDaemon(True)
    httpd_thread.start()

if displayLiveStream:
    # make backup copy of TXT display contents
    with open('/dev/fb0', 'rb') as f:
        framebuffer_backup=f.read()

#cleanup()

try:

    # initialize camera (/dev/video0)
    fps = 15 # frames per second
    width = 320 # width of camera image
    height = 240 # height of camera image
    videv = ftrobopytools.camInit(fps, width, height, 0, 0)

    if displayLiveStream:
        # initialize Standard Display Library (SDL)
        ftrobopytools.sdlInit()
        # reset text/cmd console (compromized by SDL)
        os.system('reset')

    print(XMotor.getCurrentDistance())

    initMotor(1, XMotor, XTrigger)
##  initMotor(1, ZMotor, ZTrigger)
##
```

```
## moveMotor(-1,ZMotor,ZTrigger,100)
## moveMotor(-1,ZMotor,ZTrigger,1670)
## moveMotor(-1,XMotor,XTrigger,1800)

    for i in range(100):

##     moveMotor(-1,XMotor,XTrigger,230)
##     time.sleep(0.1)
##     makePicture(videv,displayLiveStream,FocusMotor,Trigger,picture_dir)
##     time.sleep(0.5)

##     moveMotor(-1,XMotor,XTrigger,225)
##     time.sleep(0.1)
##     makePicture(videv,displayLiveStream,FocusMotor,Trigger,picture_dir)
##     time.sleep(0.5)

        moveMotor(-1,XMotor,XTrigger,720)
        time.sleep(0.1)
        makePicture(videv,displayLiveStream,FocusMotor,Trigger,picture_dir)
        time.sleep(0.5)

        moveMotor(-1,XMotor,XTrigger,245)
        time.sleep(0.1)
        makePicture(videv,displayLiveStream,FocusMotor,Trigger,picture_dir)
        time.sleep(0.5)

        moveMotor(-1,XMotor,XTrigger,230)
        time.sleep(0.1)
        makePicture(videv,displayLiveStream,FocusMotor,Trigger,picture_dir)
        time.sleep(0.5)

        moveMotor(-1,XMotor,XTrigger,230)
        time.sleep(0.1)
        makePicture(videv,displayLiveStream,FocusMotor,Trigger,picture_dir)
        time.sleep(0.5)
```



```
    moveMotor(-1, XMotor, XTrigger, 175)
    time.sleep(0.1)
    makePicture(videv, displayLiveStream, FocusMotor, Trigger, picture_dir)
    time.sleep(0.5)

    time.sleep(900)
##
##     moveMotor(-1, XMotor, XTrigger, 235)
##     time.sleep(0.1)
##     makePicture(videv, displayLiveStream, FocusMotor, Trigger, picture_dir)
##     time.sleep(0.5)
##
##     moveMotor(-1, XMotor, XTrigger, 257)
##     time.sleep(0.1)
##     makePicture(videv, displayLiveStream, FocusMotor, Trigger, picture_dir)
##     time.sleep(0.5)

# Auf Ausgang zurueck
initMotor(1, XMotor, XTrigger)

except ftrobopytools as error:
    print(error)

finally:
    # close camera device
    ftrobopytools.camClose(videv, 0)
    txt.stopOnline()
    time.sleep(0.1)
    if displayLiveStream:
        # close Standard Display Library
        ftrobopytools.sdlClose()
        # restore TXT display
        with open('/dev/fb0', 'wb') as f:
            f.write(framebuffer_backup)
```