

Pflanzenforschung

Wer nicht weglaufen kann, muss sich anpassen – Frosttoleranz bei Pflanzen

Hincha, Dirk;

Max-Planck-Institut für molekulare Pflanzenphysiologie, Potsdam-Golm
Arbeitsgruppe – Transkript-Profilung

Korrespondierender Autor

Hincha, Dirk

E-Mail: hincha@mpimp-golm.mpg.de

Zusammenfassung

Frost ist einer der wichtigsten Stressfaktoren für Pflanzen, der die Produktivität in der Landwirtschaft erheblich einschränkt. Pflanzen der gemäßigten Klimazonen können sich an niedrige Wachstumstemperaturen anpassen und dabei ihre Frosttoleranz erhöhen. Die Analyse verschiedener Populationen der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* (Ackerschmalwand) aus unterschiedlichen Klimaten zeigt die Komplexität dieser Anpassungen auf physiologischer und molekularer Ebene.

Abstract

Frost is an important factor limiting geographical distribution and agricultural productivity of plants. Temperate zone plants can adapt to low growth temperatures and thereby increase in freezing tolerance. The analysis of populations of the model plant species Arabidopsis thaliana derived from natural habitats with different climatic conditions shows the complexity of the cold acclimation response both on the physiological and the molecular level.

Da Pflanzen festsitzende (sessile) Lebewesen sind, haben sie nicht die Möglichkeit, wie die meisten Tiere, ungünstigen Umweltbedingungen auszuweichen. Pflanzen waren daher im Laufe ihrer Evolution gezwungen, sich an widrige Bedingungen wie Temperaturextreme, Trockenheit oder Bodensalinität sowohl auf anatomisch-morphologischer wie auch auf physiologischer Ebene anzupassen. Frosttoleranz ist für Pflanzen gemäßigter und kalter Klimazonen ein entscheidender Faktor für die geographische Verbreitung. In der Landwirtschaft kann Frost darüber hinaus zu katastrophalen Ernteverlusten führen und die Ausweitung von Anbauflächen begrenzen. Pflanzliche Frosttoleranz ist ein komplexes, quantitatives Merkmal, dessen Ausprägung nicht dem einfachen Mendel'schen Vererbungsschema folgt.

Pflanzen der gemäßigten Breiten sind in der Lage, während einer Akklimatisierungsphase von mehreren Tagen bis Wochen bei niedrigen Temperaturen über dem Gefrierpunkt ihre Frosttoleranz zu erhöhen. Unter natürlichen Bedingungen findet dieser Prozess im Herbst statt und bereitet die Pflanzen auf das Überleben im Winter vor. Im Frühjahr wird diese Akklimatisierung wieder rückgängig gemacht. Physiologische und biochemische Anpassungen in Pflanzen während der Akklimatisierung sind vielfach untersucht worden. Dabei ist es allerdings nur selten gelungen, Kausalketten zwischen physiologischen Veränderungen während der Akklimatisierung und der Zunahme der Frosttoleranz aufzudecken. Einer der Gründe dafür ist, dass nicht alle Veränderungen, die man an einer Pflanze in der Kälte beobachtet, direkt mit der Frosttoleranz zusammenhängen. Viele Veränderungen stellen generelle Anpassungen des Metabolismus an die niedrigen Wachstumstemperaturen dar. Diese verschiedenen Prozesse sind jedoch häufig nicht eindeutig unterscheidbar.

Die Erforschung der molekularen Grundlagen der pflanzlichen Frosttoleranz hat sich in den letzten Jahren zunehmend der Ackerschmalwand (*Arabidopsis thaliana*) bedient. *Arabidopsis* ist einer der wichtigsten pflanzlichen Modellorganismen und zeigt eine gute Kälteakklimatisierung. Da das Genom dieser Pflanze vollständig sequenziert ist, eignet sie sich gut für Experimente, bei denen die globale Regulation des Metabolismus und der zugrunde liegenden Genexpression untersucht werden sollen. Zusätzlich hat diese Art den Vorteil, dass sie im gesamten eurasischen und nordafrikanischen Raum verbreitet ist. Die weite geographische Verbreitung zwischen Äquator und Polarkreis hat zur Ausbildung von Akzessionen (Ökotypen) geführt, die an die Bedingungen ihres jeweiligen Habitats angepasst sind. Diese natürliche Diversität innerhalb einer Art ist eine exzellente Basis für das gezielte Studium von pflanzlichen Anpassungen an unterschiedliche Umweltbedingungen.

Frostschäden und Akklimation bei *Arabidopsis*

Um Unterschiede in der Frosttoleranz und der Akklimation unterschiedlicher Ökotypen untersuchen zu können, muss man zunächst Frostschäden quantifizieren können. Da Membranen die frostempfindlichsten zellulären Strukturen sind, basieren die meisten Tests für Frostschäden an Pflanzen auf Messungen der Intaktheit zellulärer Membransysteme. Für den in der Literatur am häufigsten verwendeten Test werden Blätter unter kontrollierten Bedingungen auf verschiedene Temperaturen gefroren. Nach dem Auftauen werden die Blätter in destilliertem Wasser inkubiert und dann mit Hilfe einer Leitfähigkeitselektrode die aus den Blättern ausgetretenen Elektrolyte im Wasser quantifiziert. Eine Auftragung des Elektrolytverlustes gegen die Temperatur (**Abb. 1**) erlaubt es, Unterschiede zwischen Blättern von akklimatisierten und nicht akklimatisierten Pflanzen sichtbar zu machen. Aus diesen Daten kann die LT_{50} errechnet werden, das ist die Temperatur, bei der die Blätter 50 % ihrer Elektrolyte verloren haben. Dieser Wert kann dann für quantitative Vergleiche herangezogen werden [1, 2].

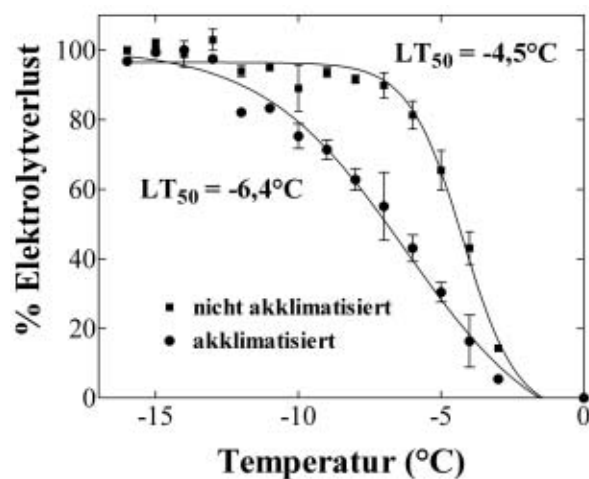


Abb. 1: Bestimmung der Frosttoleranz von Blättern von *Arabidopsis thaliana* (Akzession C24).

Die nicht akklimatisierten Pflanzen wurden bei Tag/Nacht-Temperaturen von 20°C/18°C angezogen. Zur Akklimation wurden die Pflanzen zusätzlich für 14 Tage einer konstanten Temperatur von 4°C ausgesetzt. Blätter dieser Pflanzen wurden dann langsam (2°C/Stunde) bis auf -16°C eingefroren. Bei verschiedenen Temperaturen wurden Blätter entnommen und nach dem Auftauen wurde der Verlust von Elektrolyten als Maß für die Schädigung der Zellmembranen bestimmt. Die Blätter der akklimatisierten Pflanzen zeigen eine Verschiebung der Elektrolytverluste zu niedrigeren Temperaturen. Die aus diesen Kurven errechneten LT_{50} -Werte (Temperatur, bei der die Blätter 50 % ihrer Elektrolyte verloren haben) können für quantitative Vergleiche der Frosttoleranz verschiedener Pflanzen verwendet werden.

Urheber: Max-Planck-Institut für molekulare Pflanzenphysiologie

Alternativ kann auch die Inaktivierung der Photosynthese über Veränderungen der Fluoreszenz-Eigenschaften der plastidären Membranen in den Blättern bestimmt werden. **Abbildung 2** zeigt, wie über bildgebende Verfahren die temperaturabhängige Inaktivierung der Photosynthese und die Unterschiede zwischen akklimatisierten und nicht akklimatisierten Pflanzen dargestellt werden können. Zusätzlich geben diese Messungen auch Aufschluss über die Verteilung der Frostschäden über die Blattfläche.

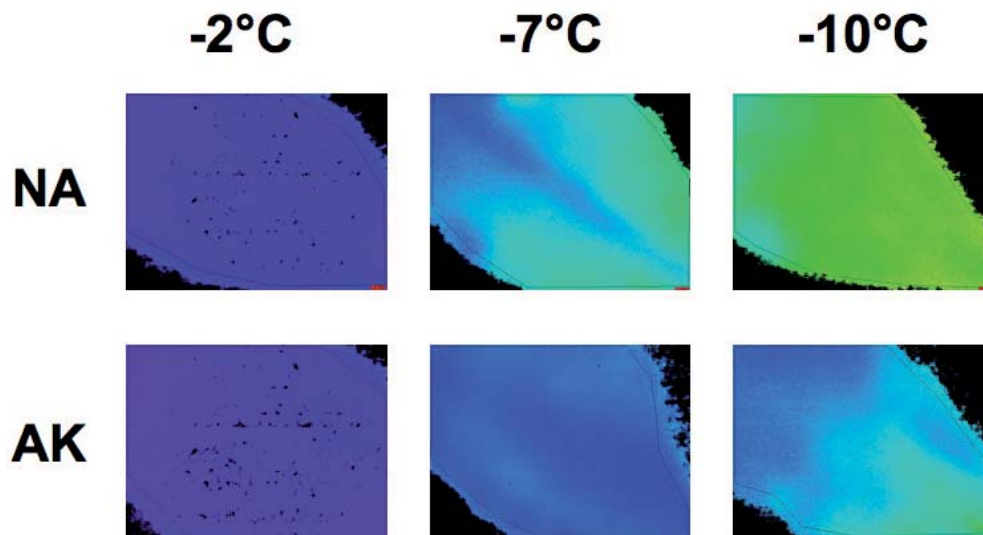


Abb. 2: Analyse von Frostschäden an Blättern von *Arabidopsis thaliana* durch Chlorophyllfluoreszenz-Messungen.

Die Experimente wurden wie in *Abbildung 1* beschrieben mit nicht akklimatisierten (NA) und akklimatisierten (AK) Pflanzen durchgeführt. Die Schädigung der Blätter resultiert in einer Verringerung der Photosyntheseleistung, die sich in einer Veränderung der Fluoreszenzemission des Chlorophylls manifestiert. Das Verhältnis von variabler zu maximaler Fluoreszenz (F_v/F_M) als Maß der photosynthetischen Produktivität ist in einer Falschfarbendarstellung gezeigt. Es ist zu sehen, dass die Inaktivierung der Photosynthese temperaturabhängig ist und durch die Akklimatisierung zu niedrigeren Temperaturen verschoben ist. Gleichzeitig zeigen die Bilder, dass die Inaktivierung der Photosynthese nicht gleichmäßig über das ganze Blatt verteilt ist, sondern von der Blattbasis zur Spitze fortschreitet.

Urheber: Max-Planck-Institut für Molekulare Pflanzenphysiologie

Natürliche Diversität in *Arabidopsis*

Als Beispiel für die Diversität innerhalb der Spezies *Arabidopsis thaliana* zeigt **Abbildung 3** Pflanzen der Akzessionen C24 und Tenela (Te). Bei C24 handelt es sich um eine Laborlinie, deren genaue Herkunft unklar ist. Sie ist jedoch genetisch sehr eng mit dem Ökotypen Co (Coimbra) aus Portugal verwandt. Te dagegen stammt aus Südfinnland (ca. 66° nördliche Breite). Es ist deutlich zu sehen, dass die Pflanzen sich in ihrem Habitus unterscheiden (z.B. Blattform, Blattlänge). Die Frosttoleranz unterscheidet sich ebenfalls deutlich, und Te zeigt bereits im nicht akklimatisierten Zustand höhere Frosttoleranz als C24 nach einer zweiwöchigen Akklimatisierung bei 4°C. Andere untersuchte Ökotypen liegen in ihrer Frosttoleranz zwischen diesen Extremen und zeigen eine klare Abhängigkeit der Frosttoleranz nach einer Akklimatisierung von der Habitatterperatur während der Wachstumsphase [5].



Abb. 3: Die *Arabidopsis thaliana*-Akzessionen C24 und Tenela (Te).

C24 ist eine Laborakzession, der keine genaue geographische Herkunft zugewiesen werden kann. Te dagegen stammt aus Südfinnland, nahe der Ortschaft Tenala (schwedisch Tenela). Diese beiden Akzessionen stellen die derzeit bekannten Extreme in der Frosttoleranz von *Arabidopsis* dar (LT₅₀ durch Messung des Elektrolytverlustes nach dem Gefrieren bestimmt, siehe Abb. 1). Gleichzeitig vermitteln die Bilder auch einen Eindruck von den Unterschieden im Habitus verschiedener Akzessionen, die der gleichen Art angehören, sich aber an unterschiedliche Umweltbedingungen angepasst haben.

Urheber: Max-Planck-Institut für Molekulare Pflanzenphysiologie

Analyse von Metaboliten und Genexpression

Um die molekulare Basis der beobachteten Unterschiede in der Frosttoleranz verschiedener *Arabidopsis*-Akzessionen zu entschlüsseln, sind in den letzten Jahren vor allem Studien zu Metabolitgehalten und zur Genexpression durchgeführt worden. **Abbildung 4** zeigt als Beispiel die Gehalte der Aminosäure Prolin und der Zucker Saccharose und Raffinose. Alle drei Substanzen können isolierte Proteine und Membranen beim Gefrieren vor Inaktivierung schützen und gelten daher als mögliche Komponenten der pflanzlichen Frosttoleranz [3]. Ihre Gehalte steigen während der Akklimation stark an (Abb. 4). Es ist jedoch eine große Variabilität in den Gehalten der unterschiedlichen Akzessionen erkennbar. Mithilfe einer Kopplung von Gaschromatographie und Massenspektrometrie kann man solche Analysen auf mehrere hundert Metabolite ausdehnen und dabei konnte gezeigt werden, dass die meisten pflanzlichen Metabolite während der Akklimation akkumulieren [4]. Diese Akkumulation steht jedoch nicht in direktem Zusammenhang mit der Frosttoleranz unterschiedlicher Akzessionen [5].

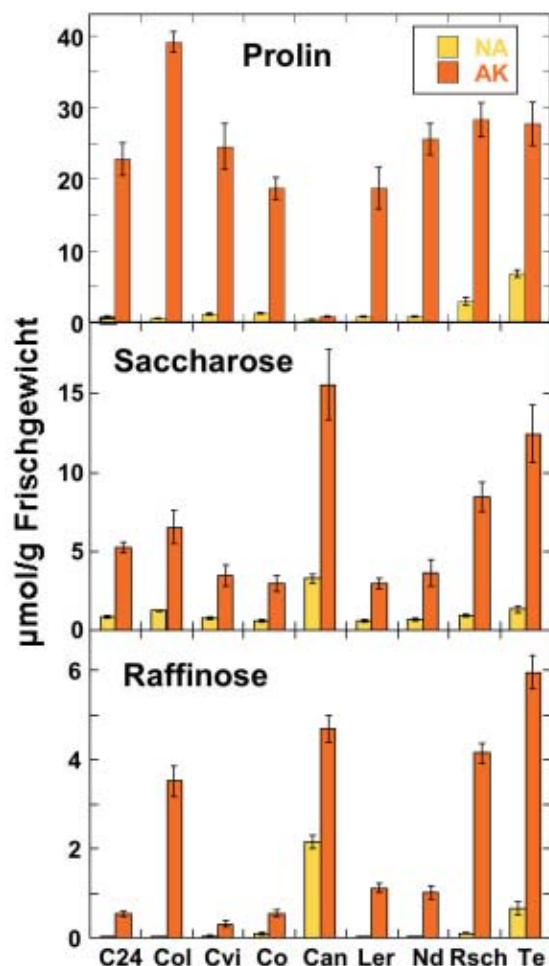


Abb. 4: Gehalte der Aminosäure Prolin und der Zucker Saccharose und Raffinose in Blättern von verschiedenen Akzessionen von *Arabidopsis thaliana* vor (NA) und nach (AK) einer 14-tägigen Akklimation bei 4°C. Prolin wurde in Blattextrakten photometrisch und die Zucker mittels Hochdruck-Flüssigchromatographie (HPLC) bestimmt. Die drei Substanzen sind Vertreter der „compatible solutes“, die in der Lage sind, biologische Strukturen beim Gefrieren zu stabilisieren. Man geht daher davon aus, dass sie eine Rolle bei der Erhöhung der Frosttoleranz während der Akklimation spielen. Die Daten zeigen die Akkumulation während der Akklimation, aber auch die große Variabilität zwischen den Akzessionen.

Urheber: Max-Planck-Institut für Molekulare Pflanzenphysiologie

Mithilfe von Microarray-Techniken wurde die Genexpression von *Arabidopsis* untersucht. Die Methode gibt einen Überblick über Veränderungen der Expression sämtlicher Gene während der Akklimatisierung. Bei den Untersuchungen zeigte sich, dass nach einer Akklimatisierung von 14 Tagen bei 4°C zwischen 1500 und 4000 Gene in ihrer Expression signifikant verändert waren. Das sind ca. 7–20 % der untersuchten 22000 Gene [5, 6]. Die Anzahl der in der Expression veränderten Gene korrelierte dabei linear mit der Erhöhung der Frosttoleranz während der Akklimatisierung [5]. Dies ist ein weiterer Hinweis auf die komplexe, quantitative Basis der pflanzlichen Frosttoleranz.

Ausblick

Diese Informationen zum Verhalten von tausenden von Genen während der Akklimatisierung sind nicht nur für unser Verständnis der Anpassung von Pflanzen an natürliche Wachstumsbedingungen wichtig, sondern können auch zur gezielten züchterischen Verbesserung der Frosttoleranz von Nutzpflanzen beitragen. Dazu ist es allerdings notwendig, Schlüsselgene für die Akklimatisierung zu identifizieren, wie zum Beispiel Gene, die für Regulatoren der Genexpression wie Transkriptionsfaktoren kodieren. Ein möglicher Ansatz ist die Korrelation der Expression aller Gene mit der Frosttoleranz der verschiedenen Ökotypen. Auf diese Weise kann man Kandidatengene identifizieren, die dann zum Beispiel in transgenen Pflanzen und Mutanten auf ihre Funktion während der Akklimatisierung getestet werden können.

Literaturhinweise

- [1] P. Rohde, D. K. Hincha and A. G. Heyer:
Heterosis in the freezing tolerance of crosses between two *Arabidopsis thaliana* accessions (Columbia-0 and C24) that show differences in non-acclimated and acclimated freezing tolerance. *The Plant Journal* **38**, 790–799 (2004).
- [2] E. Zuther, K. Büchel, M. Hundertmark, M. Stitt, D. K. Hincha and A. G. Heyer:
The role of raffinose in the cold acclimation response of *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters* **576**, 169–173 (2004).
- [3] D. K. Hincha, E. Zuther and A. G. Heyer:
The preservation of liposomes by raffinose family oligosaccharides during drying is mediated by effects on fusion and lipid phase transitions. *Biochimica et Biophysica Acta* **1612**, 172–177 (2003).
- [4] C. Guy, F. Kaplan, J. Kopka, J. Selbig and D. K. Hincha:
Metabolomics of temperature stress. *Physiologia Plantarum*, in press.
- [5] M. A. Hannah, D. Wiese, S. Freund, O. Fiehn, A. G. Heyer and D. K. Hincha:
Natural genetic variation of freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology* **142**, 98–112 (2006).
- [6] M. A. Hannah, A. G. Heyer and D. K. Hincha:
A global survey of gene regulation during cold acclimation in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genetics* **1**, e26 (2005).