

Frosttoleranz bei Pflanzen

– Fliehen, vermeiden oder einfach durchhalten!





Nur etwa ein Drittel der Fläche des Planeten Erde ist dauerhaft frostfrei: in den tropischen Regenwaldgebieten des Amazonasbeckens, in Kongo, an der afrikanischen Westküste, auf dem Indomalayischen Archipel, in einem kleinen Teil Australiens und auf den pazifischen Inseln in Äquatornähe fällt die Temperatur nie unter etwa 15 Grad (Abb. 1). Der Temperaturunterschied zwischen Tag und Nacht ist hier größer als der zwischen Sommer und Winter. Fast die Hälfte aller Pflanzenarten – 115.000 von 250.000 bekannten Blütenpflanzen – kommen nur hier vor. Daraus lässt sich bereits ablesen, dass der Umgang mit niedrigen Temperaturen eine Herausforderung für lebende Organismen ist, der sich nicht jeder stellen mag. Andererseits locken die kälteren Gegenden mit einem großen Flächen- und Mineralstoffangebot – einer Ressource, die für Pflanzen äußerst attraktiv ist.

Darum haben Pflanzen Strategien entwickelt, die ihnen das Überleben bei niedrigen Temperaturen ermöglichen. Diese Strategien scheinen ebenso vielfältig zu sein wie die Temperaturbereiche, auf die sie zugeschnitten sind. Genau wissen wir es nicht, denn es ist bis heute nicht ganz klar, wie Pflanzen mit Kälte umgehen. Wir wissen immerhin, dass es drei Klassen von Pflanzen mit grundsätzlich verschiedenen Ansprüchen an die Wachstumstemperatur gibt: die Pflanzen der tropischen Regenwälder, aber auch Tomaten, Gurken oder Usambaraveilchen sind kühlempfindlich, das heißt sie werden bei Temperaturen weit oberhalb des Gefrierpunkts von Wasser geschädigt. Bei einigen Bananen-Varietäten liegt die kritische Temperatur bei etwa 25 Grad, für Gurken und Tomaten beträgt sie fünf bis zehn Grad. Pflanzen wie die Kartoffel, die aus dem kühleren Andengebiet von Peru bis Nordwest-Argentinien stammt, sind kühletolerant, können aber Temperaturen unterhalb des Gefrierpunkts nicht überstehen, sind also frostempfindlich. Zumindest gilt das für die Kultursorten, die bei

uns angebaut werden. Einige Wildformen der Kartoffel können Temperaturen bis minus elf Grad überstehen. Sie gehören damit in die dritte Klasse, die Klasse der winterharten Spezies, die auch bei Temperaturen unterhalb des Gefrierpunkts für lange Zeit überleben können.

Neben dem Wasserangebot stellt die Temperatur die entscheidende Ausbreitungsgrenze für Pflanzen dar. Sie wirkt dabei in mehrfacher Weise: die Jahreshöchst- und -mindesttemperaturen schließen diejenigen Organismen aus, deren Toleranzgrenzen darunter beziehungsweise darüber liegen. Indirekt hängen sie aber auch noch mit einer anderen Größe zusammen: je tiefer die Temperaturen im Winter, desto kürzer ist die für Pflanzen nutzbare Vegetationszeit, denn sie kann erst beginnen, wenn die durchschnittliche Tagestemperatur über etwa zehn Grad liegt. So ist die durchschnittliche Januar-Temperatur ein guter Indikator für die maximale Dauer der Vegetationsperiode, das heißt derjenigen Jahreszeit, in der Pflanzen wachsen, also eine positive Biomasse-Bilanz hervorbringen können.

Arnd G. Heyer ■
Frosttoleranz bei Pflanzen ■

Wechselwirkungen ■ Der saisonale Aspekt von Temperatur wird um so bedeutsamer, je weiter wir uns vom Äquator entfernen: der Unterschied zwischen Sommer und Winter wird dabei immer größer, der zwischen Tag und Nacht immer kleiner. So liegen in Tromsø in Norwegen Tages- und Nachttemperaturen nur um vier bis sieben Grad auseinander, während sich die durchschnittlichen Januar- und August-

temperaturen um 16 Grad unterscheiden. In Nakuru in Kenia ist es umgekehrt: der Tag-/Nacht-Rhythmus bringt einen Unterschied von 20 Grad, während der Sommer nur um vier Grad wärmer ist als der Winter (Abb. 2).

Weglaufen kommt nicht in Frage

Saisonalität erlaubt den Pflanzen eine Anpassungsstrategie, die man ihnen als sesshaften Lebewesen auf den ersten Blick nicht zutraut: die so genannte „escape“ oder Ausweich-Strategie. Für Tiere ist es selbstverständlich, ungünstigen Umweltbedingungen auszuweichen, einfach davon zu laufen. Wenn man aber fest im Boden verwurzelt ist, kommt Weglaufen nicht in Frage. Dennoch können viele Pflanzen der Kälte entkommen! Sie machen das Auskeimen abhängig vom Lichtangebot und der Umgebungstemperatur. So stellen sie sicher, dass die empfindlichen Keimlinge erst im Frühling aus dem Boden kommen. Dann nutzen sie das meist reichliche Wasser- und Lichtangebot zu Beginn des Jahres, um ihren Lebenszyklus rasch abzuschließen. Wenn es im Herbst wieder kälter wird, sind die Samen der nächsten Generation längst gereift, und der Rest der Biomasse wird nun ohnehin absterben. Den Samen kann der Winter nicht viel anhaben: sie haben einen sehr geringen Wassergehalt, betreiben fast keinen Stoffwechsel und sind daher weitgehend temperatur-unempfindlich. Diese Strategie können einjährige, krautige Pflanzen nutzen – für Bäume und mehrjährige Sträucher, die eine aufwändige Biomasse produzieren, bevor sie zum ersten Mal blühen, ist die Flucht ausgeschlossen. Sie können zwischen den beiden anderen Optionen wählen: der Vermeidung und der Toleranz.

Wie können Pflanzen Frost vermeiden? Bis zu einem gewissen Umfang sind Pflanzen durchaus zur Wärmeproduktion in der Lage. Der Aronstab (*Arum maculatum*, Abb. 3) kann seine Blüte um etwa 25 Grad gegenüber der Umgebungstemperatur aufheizen. Er tut dies, um Lockstoffe für Fliegen zu verdunsten, die die Blüten bestäuben sollen. Aber schon aus theoretischen Erwägungen ist die Wärmefreisetzung keine dauerhafte Option: anders als Tiere sind Pflanzen Primärproduzenten chemischer Energie. Das „Verfeuern“ energiereicher Kohlenstoff-Ver-

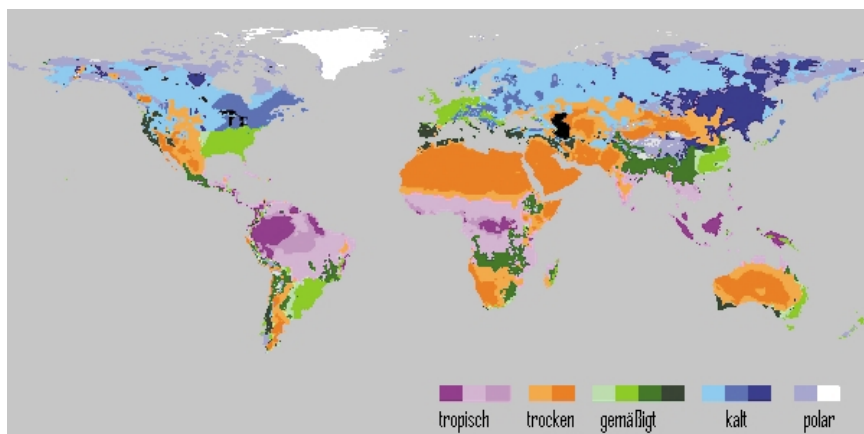


Abb. 1: Klimazonen der Erde. Nur etwa ein Drittel unseres Planeten ist dauerhaft frostfrei. In den tropischen Gebieten Südamerikas, Afrikas, des pazifischen und des indischen Ozeans fällt die Temperatur nicht unter 15 Grad Celsius – überall sonst müssen die Organismen mit Temperaturen unterhalb des Gefrierpunkts von Wasser zurechtkommen können.

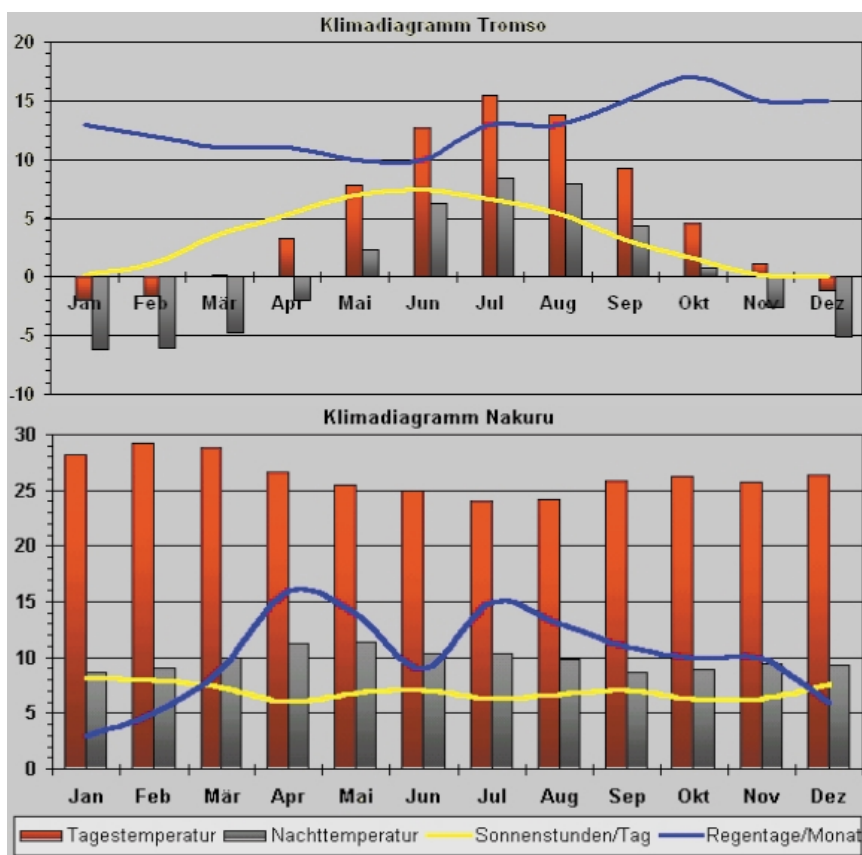


Abb. 2: Klimadiagramme von Tromsø, Norwegen, und Nakuru, Kenia. Nahe am Äquator sind die Temperaturunterschiede zwischen Tag und Nacht groß, aber Winter und Sommer unterscheiden sich kaum. Weit vom Äquator entfernt dominieren die Unterschiede der Jahreszeiten, Tag/Nacht-Rhythmen fallen dagegen geringer aus.

bindungen kommt einem direkten Biomasseverlust gleich. Ein Aufwärmen des Organismus mit dem Ziel, Stoffwechsel betreiben zu können, würde also spätestens bei derjenigen Temperatur an eine Grenze stoßen, bei der die „Heizkosten“ den Gewinn durch die Photosynthese auffressen. Frostvermeidung bei Pflanzen bedeutet etwas anderes und hat etwas mit den physikalischen Besonderheiten des Wassers zu tun. In einem Wassermolekül stehen zwei Wasserstoff-Atome in einem Winkel von 106 Grad von einem Sauerstoffatom ab wie zwei Mickey-Maus Ohren. Der Sauerstoff hat zwei freie Elektronenpaare, sozusagen die Füße des Moleküls (Abb. 4). Die Elektronenpaare sind negativ, die Kerne der Wasserstoffatome positiv geladen – und jeder sucht nach einem Partner mit gegensinniger Ladung. Der Winkel zwischen den Wasserstoffkernen verbietet die Wechselwirkungen der beiden Elektronenpaare eines Wassermoleküls mit den „Ohren“ eines zweiten. Stattdessen bilden sich Ketten

von Einzelmolekülen, bei denen es selten ist, dass beide Ohren und beide Füße gleichzeitig assoziiert sind. Darum ist im Wasser kaum ein Molekül wie ein anderes umgeben, und die Konsequenz ist, dass Wasser relativ ungeordnet ist und darum nicht so leicht kristallisiert. Deshalb friert Wasser nicht bei null Grad ein, wenn keine Verunreinigungen darin gelöst sind, die als Kristallisationskeime wirken. Absolut reines Wasser friert erst bei minus 38 Grad ein – dann allerdings schlagartig und mit einem hörbaren Knall. Viele Pflanzen vermeiden das Einfrieren von Wasser, indem sie die Konzentration an Kristallisationskeimen so gering wie möglich halten. Das erlaubt es ihnen, flüssiges Wasser bis zu einer Temperatur von etwa minus 30 Grad zu unterkühlen. Auf diese Weise überstehen die Blütenknospen des Rhododendron den Winter (Abb. 5). In einigen Bäumen können die Leitgefäße des Xylems (Wasser leitender Gefäßteil) Wasser sogar bis zu einer Temperatur von minus 47 Grad

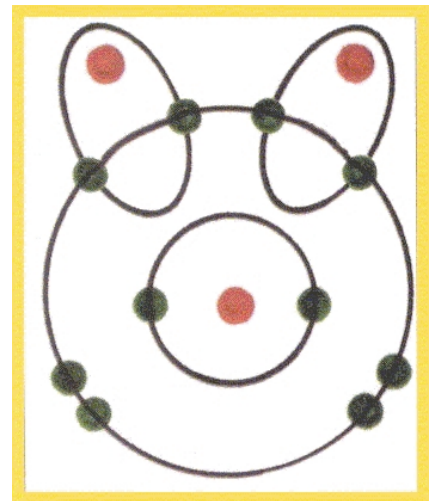


Abb. 4: Molekülmodell des Wassers. In einem Wassermolekül stehen zwei Wasserstoff-Atome in einem Winkel von 106 Grad von einem Sauerstoffatom ab wie zwei Mickey-Maus Ohren. Die Atomkerne sind jeweils rot, die Elektronen auf ihren Bahnen schwarz dargestellt. Der Sauerstoff hat zwei freie Elektronenpaare (unten), die die Füße des Moleküls bilden. Die Anordnung der elektronegativen freien Elektronenpaare und der Kerne der Wasserstoffatome verbietet Wechselwirkungen beider Elektronenpaare mit den Atomkernen eines zweiten Wassermoleküls. Im flüssigen Wasser bilden sich daher Ketten von Einzelmolekülen, bei denen kaum zwei Moleküle die gleiche Umgebung haben.



Abb. 3: Der Aronstab besitzt gestielte, pfeilförmige Blätter, zwischen denen der Blütenstand mit einer tütenförmigen Blütenscheide entsteht. Sie bedeckt den Kolben. Der Kolben enthält im unteren Bereich die weiblichen Blüten, im oberen die männlichen. Der Blütenstand wird von der Pflanze aufgeheizt, um einen unangenehmen Duft zu verströmen, der bestäubende Insekten anlockt. Die ganze Pflanze ist giftig.



Abb. 5: Die Blütenknospen des immergrünen Rhododendron überstehen den Winter, indem sie das Einfrieren von Wasser verhindern. Sie entziehen dem Wasser die Kristallisationskeime, so dass es bis zu einer Temperatur von minus 25 bis minus 30 Grad flüssig bleibt. Bei noch tieferen Temperaturen würde die Pflanze erfrieren.

unterkühlen. Zusätzlich zur Vermeidung von Kristallisationskeimen wird hierfür wohl noch eine Gefrierpunktniedrigung genutzt – aber ganz aufgeklärt ist das Phänomen nicht. Für die meisten immergrünen Pflanzen stellen Tiefsttemperaturen zwischen minus 15 und minus 40 Grad eine Ausbreitungsgrenze dar: Mammutbäume, Magnolien, viele Rhododendron-Arten oder Efeu kommen bei noch tieferen Temperaturen nicht mehr vor.

tremen Fall verliert die Zelle so viel Wasser, dass das Cytoplasma seine Fluidität verliert. Man spricht dann von „Verglasung“ oder „Vitrifikation“. Dieser Prozess ist beispielsweise in Samen eine wichtige Voraussetzung für die Lagerfähigkeit. Im verglasten Zellinneren sind alle Prozesse so stark verlangsamt, dass Ruhephasen auch unter ungünstigen Bedingungen gefahrlos überstanden werden können.

Frosttoleranz ist sehr variabel: bei manchen Pflanzen reicht sie nur bis wenige Grade unter Null, einige Bäume und Sträucher wie zum Beispiel der weiße Hartriegel (*Cornus sericea*, Abb. 7) können auch dann wieder austreiben, wenn ihre Äste in flüssigem Stickstoff bei minus 196 Grad eingefroren waren.

Wie kommen diese Unterschiede zustande? Bis heute ist nicht abschließend geklärt, was Pflanzen frosttolerant macht. Wir wissen, dass es zwei unterschiedliche Arten von Frosttoleranz gibt: eine basale, die die Pflanzen schützt, auch wenn sie noch nie der Kälte ausgesetzt waren. Sie ist eine Art genetischer Voreinstellung, eine ererbte Toleranz, die etwas ganz anderes ist als die Fähigkeit zur Akklimatisierung, also zur kältebedingten Ausbildung von Frosttoleranz. Beide Formen der Toleranz sind sehr komplexe Eigenschaften, an deren Zustandekommen eine Vielzahl von Genen beteiligt ist. Wir kennen einige davon, aber längst nicht genug, um erfolgreich züchterisch die Frosttoleranz von Pflanzen verbessern zu können.

Nadelbäume wie Fichten, Kiefern und Tannen sind aber viel widerstandsfähiger. Ihnen können Temperaturen von minus 80 Grad nichts anhaben – ihre Ausbreitung wird also nicht durch die tiefste Jahrestemperatur begrenzt, sondern durch die Länge der Vegetationsperiode. Besonders beeindruckend ist dies an der „Baumgrenze“ sichtbar, jener relativ scharf gezogenen Linie, die die montanen Wälder von den alpinen, baumfreien Regionen trennt (Abb. 6). Die Baumgrenze wird neben der Temperatur noch von anderen Faktoren beeinflusst, zu denen das Weideverhalten von Schafen und anderen Tieren, das Vorkommen von Schädlingen und die Wasserverfügbarkeit gehören. Die Temperatur ist jedoch eine maßgebliche Größe, zumal sie die anderen Faktoren beeinflusst.

Frosttoleranz ist sehr variabel

Pflanzen, die das Einfrieren überstehen können, ohne dabei großen Schaden zu nehmen, werden als „frosttolerant“ bezeichnet. In ihren Geweben bilden sich echte Eiskristalle, ohne dass die Zellen zerstört werden. Das liegt daran, dass die Eiskristalle nicht in den Zellen, sondern nur in den Bereichen dazwischen, den so genannten Interzellularen, entstehen. Diese sind normalerweise gasgefüllte Räume, die in einem Blatt einen Großteil des Volumens ausmachen können. Die Eisbildung außerhalb der Zellen ist sogar eine wichtige Voraussetzung für das Überleben: Eis hat ein geringeres Wasserpotenzial als flüssiges Wasser. Da die Wasserkonzentration außerhalb der Zellen also scheinbar geringer ist, diffundiert immer mehr Wasser hinaus und friert dort ein. Gleichzeitig werden die Zellen entwässert, der Zellsaft wird aufkonzentriert. Die immer höher werdende Konzentration an gelösten Stoffen im Zellsaft senkt die Gefahr der intrazellulären Eisbildung, die den sicheren Tod bringen würde. Im ex-



Abb. 6: Die Baumgrenze trennt die montanen Wälder von der alpinen, baumfreien Region. Oberhalb dieser Linie ist die Dauer der Vegetationsperiode zu gering, um das Überleben von Bäumen zu ermöglichen. Außer der Temperatur haben noch andere Faktoren einen Einfluss, so das Weideverhalten von Schafen und anderen Tieren, das Vorkommen von Schädlingen oder Umweltgiften und die Wasserverfügbarkeit. Aus diesem Grund ist die Lage der Baumgrenze veränderlich.



Abb. 7: Der weiße Hartriegel (*Cornus sericea*) kann extrem tiefe Temperaturen überstehen. Zweige, die zuvor langsam auf eine Temperatur von minus 40 Grad gebracht wurden, überleben ein Bad in flüssigem Stickstoff (-196°C) oder sogar flüssigem Helium (-236°C).

Deshalb haben wir damit begonnen, Frosttoleranz in einer Modellpflanze systematisch zu untersuchen, Stoffwechsellvorgänge aufzuklären, die am Zustandekommen der Toleranz beteiligt sind, deren Beitrag zu erfassen und die zugrundeliegende genetische Ausstattung zu identifizieren. Hierfür verwenden wir eine Pflanze, die über ganz Europa verbreitet ist und in zahlreichen lokalen Populationen vorkommt, die sich in ihrer Frosttoleranz ganz erheblich unterscheiden. Es handelt sich um die Modellpflanze *Arabidopsis thaliana*, die in den 80er Jahren in der Molekularbiologie Furore machte, weil sie ein für Pflanzen erstaunlich kleines, geradezu überschaubares Genom von nur etwa 130 Millionen Einzelbausteinen, so genannten Nucleotiden, besitzt. Inzwischen ist die vollständige Sequenz dieser Nucleotide bekannt – ähnlich wie beim Menschen, dessen Erbgut immerhin 25 mal so groß ist. Genau wie beim Menschen bedeutet die Kenntnis der Nucleotidreihenfolge allerdings noch lange nicht, dass wir die enthaltene Information verstanden hätten. Daran arbeiten weltweit viele Forschungslabors.

Arabidopsis ist eine unscheinbare, einjährige Pflanze (Abb. 8), die Europa nach



Abb. 8: *Arabidopsis thaliana*, die Ackerschmalwand, ist eine unscheinbare, einjährige Pflanze, die durch ihr kleines Genom Berühmtheit erlangte. Die Sequenz des Erbguts ist inzwischen vollständig bekannt, und *Arabidopsis* ist zum wichtigsten Modellorganismus in der Pflanzenforschung geworden.

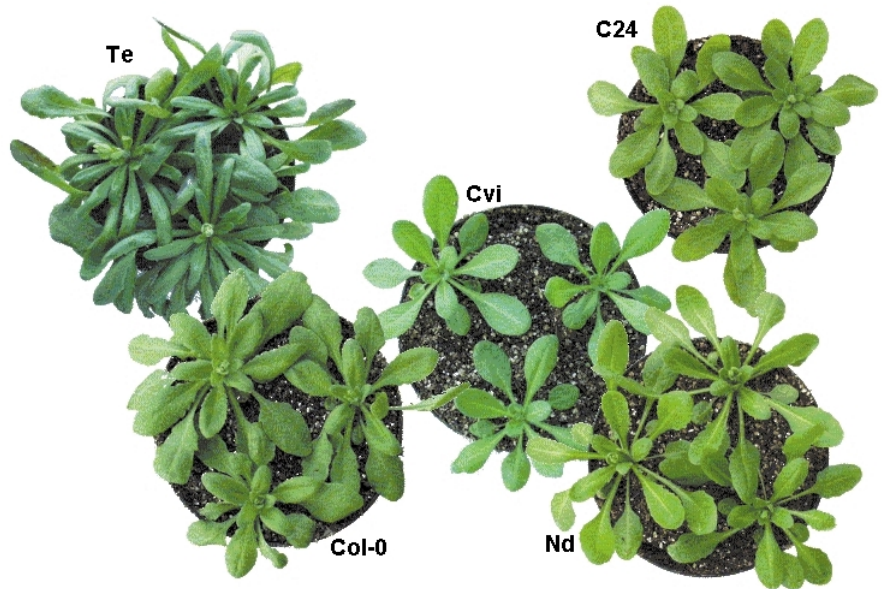


Abb. 9: Ökotypen von *Arabidopsis thaliana*. *Arabidopsis* ist über ganz Europa und Nord-Afrika verbreitet. Die Populationen sehen nicht nur unterschiedlich aus, sondern sind auch ganz spezifisch an ihre jeweiligen Lebensräume angepasst. Te: Tenedos, Finnland; C24: Portugal; Cvi: Cap Verde'sche Inseln; Col-0: wahrscheinlich Mitteleuropa; Nd: Niederzenns, Deutschland.

der Eiszeit wahrscheinlich von zwei Zentren aus, der Iberischen Halbinsel und Asien, wieder besiedelt hat (Sharbel et al., 2000). Die kleine Rosettenpflanze mit dem deutschen Namen „Ackerschmalwand“ hat einen kurzen Lebenszyklus, produziert eine große Menge an Samen und stellt keine hohen Ansprüche an den Boden. Dies hängt damit zusammen, dass *Arabidopsis* sehr konkurrenzschwach ist, das heißt, es gelingt ihr kaum, sich gegen andere Pflanzen durchzusetzen (Pigliucci and Hayden, 2001). Es handelt sich also um eine typische „Ruderal-Pflanze“: sie besiedelt Standorte, an denen noch keine anderen Pflanzen gewachsen sind. Das gilt zum Beispiel für Ackerflächen, die durch die Bodenbearbeitung regelmäßig gestört werden und darum keine stabilen Lebensgemeinschaften entwickeln. Daher der Name „Ackerschmalwand“.

Als Einjährige mit einem raschen Lebenszyklus wäre *Arabidopsis* der ideale Kandidat für die „escape“-Strategie, die keiner Frosttoleranz bedarf. Tatsächlich treffen wir bei den iberischen Populationen auf recht empfindliche Pflanzen: bei etwa minus vier Grad werden die Blätter zu 50 Prozent geschädigt, kälte-akklimatisierte Pflanzen halten bis etwa minus sechs Grad durch. Ganz anders verhält es sich aber mit Populationen von weiter nördlich gelegenen Standorten. Sie zeigen schon im nicht akklimatisierten Zustand eine Frosttoleranz bis minus sieben Grad, und im Winter überleben die Pflan-

zen minus 12 Grad. Offenbar hat sich bei der Ausbreitung von *Arabidopsis* nach Nord-Europa eine Zunahme der Frosttoleranz entwickelt.

Um dem nachzugehen, haben wir von Nord-Afrika bis nach Skandinavien und Russland lokale Populationen von *Arabidopsis*, so genannte Ökotypen, ausgewählt (Abb. 9). Schon äußerlich sind die Pflanzen recht unterschiedlich, und diese Unterschiede spiegeln sich im jeweiligen Genom der Ökotypen wider. *Arabidopsis* ist eine überwiegend selbstbestäubende Pflanze. Der genetische Austausch verschiedener Populationen ist daher gering. Die lokalen Populationen sind folglich recht isoliert und gehen evolutionär eigene Wege. Als wir die Frosttoleranz der verschiedenen Ökotypen untersuchten, fanden wir eine sehr gute Korrelation der Toleranz – vor allem der akklimatisierten Pflanzen – mit der Entfernung vom Äquator, also dem nördlichen Breitengrad (Abb. 10).

Schon vor einigen Jahren konnten Wissenschaftler nachweisen, dass vor allem die zellulären Membranen bei Frost gefährdet sind – in erster Linie die Plasmamembran, aber auch die Membranen der Chloroplasten, jener pflanzlichen Organellen, in denen die Photosynthese stattfindet (Steponkus, 1984; Hinch and Schmitt, 1992). Die Membranen reagieren empfindlich auf den Wasserentzug, der die Zellen ansonsten vor der intrazel-

lulären Eisbildung schützt. Entzieht man einer Membran nämlich die Wassermoleküle, die die „Köpfchen“ der Lipide umgeben (Abb. 11), dann verliert sie ihre Beweglichkeit und erstarrt zu einem Gel. Damit werden einerseits Transportprozesse behindert, andererseits erfolgt die Gelbildung nicht gleichmäßig, sondern in manchen Membranbereichen schneller als in anderen. Durch die Ausbildung von Domänen mit unterschiedlicher Beweglichkeit kommt es zu Beschädigungen der Membran, Löcher entstehen und die Zellen verlieren ihre Inhaltsstoffe. Neben der Ausbildung von Gelen kann es auch zur Entstehung von Micellen kommen, wenn benachbarte, de-hydrierte Membranen miteinander fusionieren. Eine Verschmelzung von Plasmamembran und Plastidenhülle bedeutet dabei den Untergang der Zelle. Wie die Zellen sich vor diesen Schädigungen schützen, ist noch nicht ganz aufgeklärt, aber wir haben bei Arbeiten mit Modell-Membranen wichtige Hinweise erhalten. So fanden wir heraus, dass die Kopfgruppen der Lipide aus Hühnerei sich anstelle von Wasser auch mit einer Reihe von Zuckermolekülen umgeben können und dadurch unterschiedlich gut gegen Gefrierschäden geschützt werden. Die Schutzwirkung von Saccharose und Trehalose, einem besonders bei Hefe wichtigen Zuckermolekül, war schon bekannt.

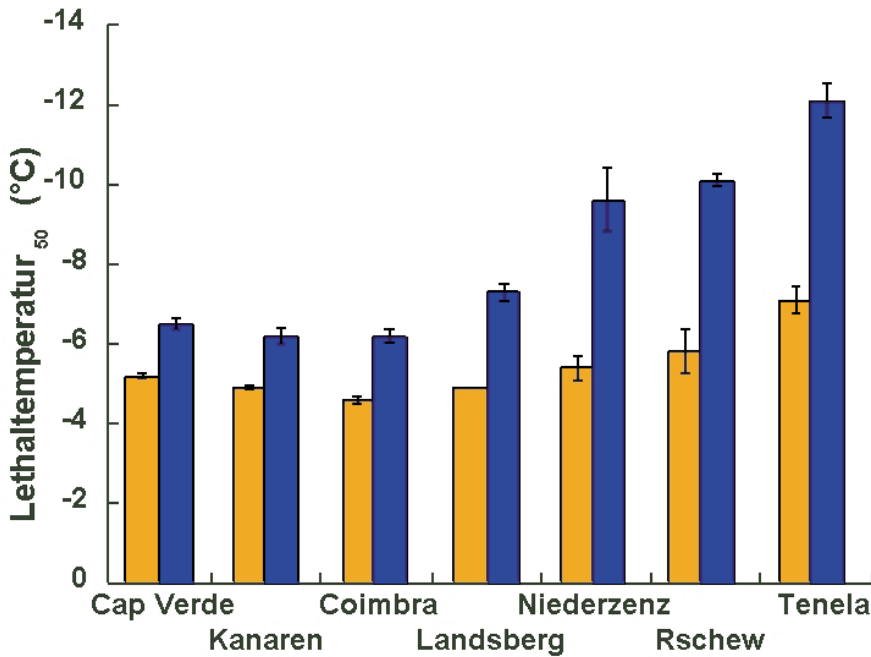


Abb. 10: Frosttoleranz von *Arabidopsis thaliana*. Von Links nach rechts sind die Ökotypen nach zunehmender Entfernung vom Äquator angeordnet. Die Toleranz nicht akklimatisierter Pflanzen ist orange, die der akklimatisierten Pflanzen blau dargestellt. Die Lethaltemperatur₅₀ ist diejenige Temperatur, bei der die Zellen des Blattgewebes zu 50 Prozent geschädigt sind. Deutlich ist zu erkennen, dass die Toleranz akklimatisierter Pflanzen nach Norden hin zunimmt.

Die Ursache dafür, dass eine Pflanze mit typischem „escape“-Verhalten dennoch Frosttoleranz entwickelt, dürfte bei *Arabidopsis* wiederum mit der Konkurrenzschwäche zusammenhängen: da die Pflanzen sehr früh im Jahr auskeimen, können ihnen die Fröste zu Beginn der Vegetationsperiode noch gefährlich werden. Das erklärt auch, warum *Arabidopsis* so schnell auf niedrige Temperaturen reagiert: schon nach einem Tag bei vier Grad nimmt die Toleranz zu. Während der Akklimatisierung kommt es zu weitreichenden Veränderungen im Stoffwechsel der Pflanzen. Wachstumsprozesse werden rasch unterbrochen, und die Zellen beginnen mit der Produktion von Frostschutzmitteln. Aber was muss geschützt werden – und wie?

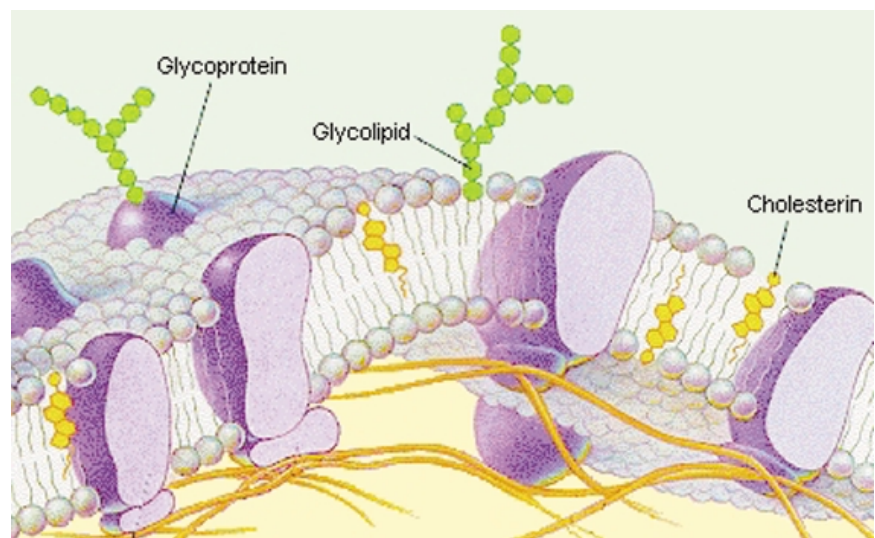


Abb 11: Modell einer biologischen Membran. Die Membran besteht aus einer Doppelschicht von Lipiden, in die Proteine (lila), Kohlenhydrate und Cholesterin (gelb) eingelagert sind. Die Lipide bestehen aus einer von Wassermolekülen umgebenen Kopfgruppe (grau) und zwei hydrophoben Fettsäureketten. Die Ketten sind beweglich, solange die Kopfgruppen vom Wasser auf Abstand gehalten werden. In diesem Zustand ist die Membran flüssig-kristallin.

Raffinose – ein guter Kandidat als Frostschutzmittel?

Wir konnten aber nachweisen, dass einige größere Zuckermoleküle aus drei bis fünf Einzelbausteinen unterschiedlicher Struktur noch stärker als Saccharose wirken (Hincha et al., 2002; Hincha et al., 2003). Insbesondere die Raffinose, ein Trisaccharid aus Galaktose, Glukose und Fruktose, ist besonders interessant. Sie wird von verschiedenen Pflanzen – darunter auch *Arabidopsis* – nur in der Kälte und in Samen gebildet und hat hervorragende Schutzwirkung. In unserer Ökotypensammlung korreliert der Raffinosegehalt mit der Frosttoleranz. Es lag also nahe, in der Raffinose einen guten Kandidaten für ein Frostschutzmittel zu vermuten. Wir haben deshalb den Stoffwechsel von *Arabidopsis*-Pflanzen so verändert, dass sie mehr Raffinose produzieren können. Hierfür haben wir ein Gen aus Gurke übertragen, dessen Produkt die Vorstufe der Raffinose, das Galactinol, synthetisiert. Die „transgene“ *Arabidopsis* mit dem Gurkengen produziert nun auch bei Normaltemperatur Raffinose, und selbst in der Kälte, wenn die Raffinosebildung sowieso induziert wird, ist der Gehalt noch fast doppelt so hoch (Abb. 12). Für den direkten Vergleich haben wir außerdem eine Mutante ausgewählt, die aufgrund eines Gen-Defekts nicht mehr in der Lage ist, Galactinol in Raffinose umzuwandeln. Die Mutante enthält keinerlei Raffinose mehr und reichert stattdessen große Mengen Galactinol an. Zu unserer Überraschung zeigten alle drei, die Mutante, die Transgene und die Ausgangslinie, die gleiche Frosttoleranz – der Wegfall der Raffinose hatte den Pflanzen also gar nichts ausgemacht. Für diesen unerwarteten Befund gibt es zwei mögliche Erklärungen: entweder war die Raffinose gar nicht wichtig für die Frosttoleranz der Pflanzen – oder irgendeine andere Substanz, vielleicht auch mehrere andere, haben ihre Funktion übernommen. Aus unserem kleinen Experiment lässt sich einiges ableiten: zum einen sehen wir, dass die Korrelation einer Stoffmenge mit einem physiologischen Phänomen wie Kältetoleranz nicht unbedingt auf einen funktionalen Zusammenhang hinweist. Zum anderen deutet sich an, dass Frosttoleranz ein komplexes Phänomen ist.

Die Raffinose-Bildung könnte in einem nur indirekten Zusammenhang mit dem Toleranzerwerb stehen. Außer Galactinol ist Saccharose eine direkte Vorstufe der

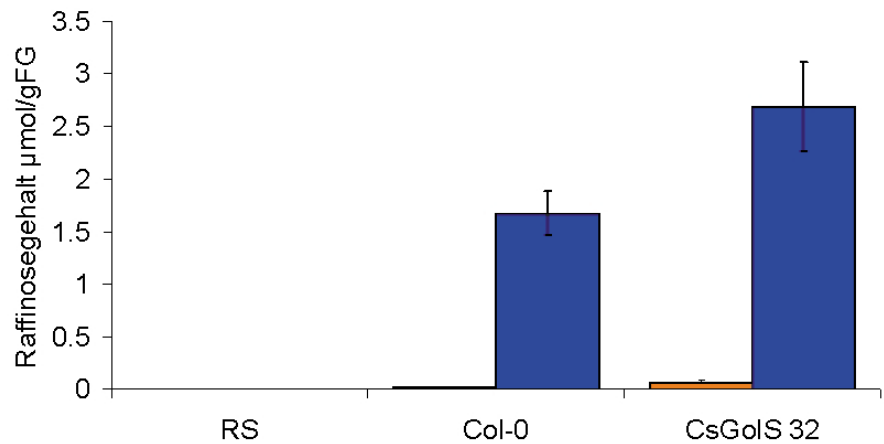


Abb. 12: Raffinosegehalte verschiedener *Arabidopsis* Genotypen. RS ist eine Mutante mit Defekt im Raffinose-Synthese Gen. Die Pflanze enthält daher keinerlei Raffinose. GcGol32 ist eine transgene Linie, die eine Galactinol-Synthase aus Gurke exprimiert. Sie hat im nicht-aklimatisierten Zustand, in dem Raffinosegehalte niedrig sind (orange), viermal mehr Raffinose als die Mutterpflanze (Col-0), im aklimatisierten Zustand (blau) ist der Gehalt noch fast zweimal so groß. Trotz der deutlichen Unterschiede im Raffinosegehalt zeigen alle drei Pflanzen die gleiche Frosttoleranz.

Raffinose-Synthese. Und Saccharose ist die Hauptdrehscheibe des pflanzlichen Stoffwechsels: sie ist das eigentliche Endprodukt der Photosynthese, ist Transportform für die Versorgung der Wurzeln und Blüten und fungiert als Signalmolekül, das die Pflanze über ihren Stoffwechsel-Status informiert. Ein Eingriff in den Raffinose-Haushalt könnte also Nebenwirkungen haben – und zwar selbst dann, wenn – wie in unserem Fall – der Saccharosegehalt weder bei der Mutante noch bei der Transgenen verändert ist. Es kommt nämlich nicht unbedingt auf die Konzentration eines Stoffes an, wenn dieser einem raschen Umsatz unterliegt. Eben dieser Umsatz kann entscheidend sein: der Saccharosegehalt einer Zelle ergibt sich aus dem Gleichgewicht zwischen Synthese, Abbau und Abtransport in die übrigen Gewebe der Pflanze. Zu- und Abflüsse dieses Gleichgewichts sind an der Konzentration nicht abzulesen.

Wir haben darum ein weiteres Experiment durchgeführt, bei dem wir das Gleichgewicht ganz bewusst gestört haben. In den Blattzellen nimmt die Vakuole den größten Raum ein. Sie ist eine Art wassergefüllter Vorratsraum der Zelle, in dem Mineralsalze, aber auch Zellgifte gelagert werden, weil sie den eigentlichen Stoffwechsel hier nicht stören. Auch Zucker werden gespeichert, und dafür kommen in der Vakuole Enzyme – die so genannten Invertasen – vor, die Saccharose in die Bestandteile Glukose und Fruktose zerlegen. In dieser Form können die Zucker die Vakuole wahrscheinlich nicht mehr so leicht verlassen, werden also angereichert. Noch ist die Rolle der Invertasen nicht ganz verstanden, aber eine

der Wirkungen der Saccharose-Spaltung ist, dass die Zucker nicht abtransportiert werden können, denn Transport ist nur in Form von Saccharose möglich. Wiederrum durch einen gentechnischen Eingriff haben wir die Invertase-Aktivität reduziert mit der Folge eines bis zu fünffachen Anstiegs der Saccharose-Konzentration. Dieser Eingriff hatte bei einem frostsensitiven iberischen Ökotyp (C24) keinerlei Folgen für die Kältetoleranz.

Sind es also doch nur einige wenige Substanzen, die für die unterschiedliche Toleranz von C24 und Columbia verantwortlich sind? Wenn das zuträfe, müsste sich die Toleranz von Columbia durch Kreuzung leicht auf C24 übertragen lassen. Mit einem kleinen Trick kann man die Selbstbestäubung verhindern und dann mit dem Pollen von Columbia die Blüten von C24 bestäuben. In der Filialgeneration enthalten alle Nachkommen jeweils gleich viele Chromosomen von beiden Eltern, sind also vollständig heterozygot. Rein theoretisch sollte die Frosttoleranz in dieser Generation einen mittleren Wert einnehmen. Bei den Folgenerationen kommt es dann aufgrund von Rekombinationen zu einer zufälligen Entmischung der Genome. In den weiteren Nachkommenschaften werden die Individuen also genetisch verschieden sein, und immer dann, wenn die wichtigen Gene von Columbia homozygot vorliegen, sollte die Frosttoleranz so wie bei Columbia ausgeprägt sein. In der Praxis verhält es sich jedoch ganz anders: die Wirkung der Gene ist nicht rein additiv, es gibt Wechselwirkungen zwischen den Loci und in manchen Fällen kommt es zu einem Phänomen, das die Pflanzenzüchtung seit langem kennt und nutzt, aber noch heute nicht recht erklären kann: Heterosis. Sie ist die Überlegenheit heterozygoter Nachkommen gegenüber beiden

Eltern. Man beobachtet Heterosis vor allem bei komplexen Eigenschaften wie der Ertragsbildung landwirtschaftlicher Nutzpflanzen oder deren Wuchshöhe. Komplexität scheint geradezu eine Voraussetzung für Heterosis zu sein, denn sie lässt Spielraum für die Interaktion verschiedener genetisch bedingter Merkmale der beiden Eltern.

Auch die Kreuzung von C24 und Columbia zeigt Heterosis (Abb. 14). Die heterozygoten Nachkommen sind größer und produzieren mehr Samen als die Eltern. Aber nicht nur das: sie sind auch frosttoleranter. Die Lethal-Temperatur der akklimatisierten Nachkommen liegt ein Grad unter der von Columbia (Rohde et al., 2004). Ob hierfür ausschlaggebend ist, dass vom jeweils besser ausgestatteten Elternteil das jeweils überlegene Gen beigesteuert wurde oder ob zwei verschiedene Varianten desselben Gens vorliegen müssen, ist nicht ganz klar. Zwischen drei Theorien zur Heterosis kann bislang noch nicht eindeutig entschieden werden. Eins ist aber klar: Frosttoleranz muss eine komplexe Eigenschaft sein. Mit einigen wenigen Genen oder einer Hand voll Metaboliten kann man das Phänomen nicht erklären.

Deshalb haben wir damit begonnen, die Akklimatisierung systematisch zu untersuchen. Für den Genotyp Columbia ha-

Im Genotyp Columbia, der ein deutlich höheres Akklimatisierungspotenzial aufweist, nahm die Toleranz jedoch um zwei Grad zu (Abb. 13). Offensichtlich kann also eine Veränderung des Saccharosehaushalts die Frosttoleranz beeinflussen – aber dies ist von genetisch bedingten Voraussetzungen abhängig. Bei Genotypen mit nur geringer Akklimatisierungskapazität bleibt sie wirkungslos. Dies könnte einerseits darauf hindeuten, dass in der iberischen Varietät C24 irgendeine weitere, essentielle Komponente fehlt, oder dass die Saccharose nicht selbst wirkt, sondern als Substrat für die Synthese anderer Frostschutzmittel genutzt wird, zu deren Bildung C24 nicht in der Lage ist.

Hinweise, die für die zweite Möglichkeit sprechen, erhielten wir bei einer umfassenden Metabolit-Analyse der transgenen Pflanzen. Das so genannte „*Metabolite Profiling*“ zielt auf einen Vergleich der Konzentrationen möglichst vieler Stoffwechselprodukte bei verschiedenen Genotypen oder unterschiedlich behandelten Pflanzen. Hierbei zeigte sich, dass die Steigerung der Saccharosekonzentration in Columbia-Pflanzen umfangreiche Veränderung auch im Aminosäure-Stoffwechsel bedingt, während dies bei C24 nicht der Fall ist. Unter den Aminosäuren, die in Columbia vermehrt auftreten, befindet sich das Prolin, ein Molekül mit ungewöhnlichen Eigenschaften, das als „Super-Osmolyt“ an vielen Stressreaktionen beteiligt ist. Daneben wird aber auch Glutamin angereichert – eine Aminosäure, die in Pflanzen bislang kaum im Zusammenhang mit Kältestress aufgefallen war, wohl aber bei Bakterien (Frings et al., 1993). Das Glutamin hat eine positiv geladene Seitenkette und könnte daher mit den negativ geladenen Kopfgruppen der Lipide wechselwirken (Anchordoguy et al., 1988).

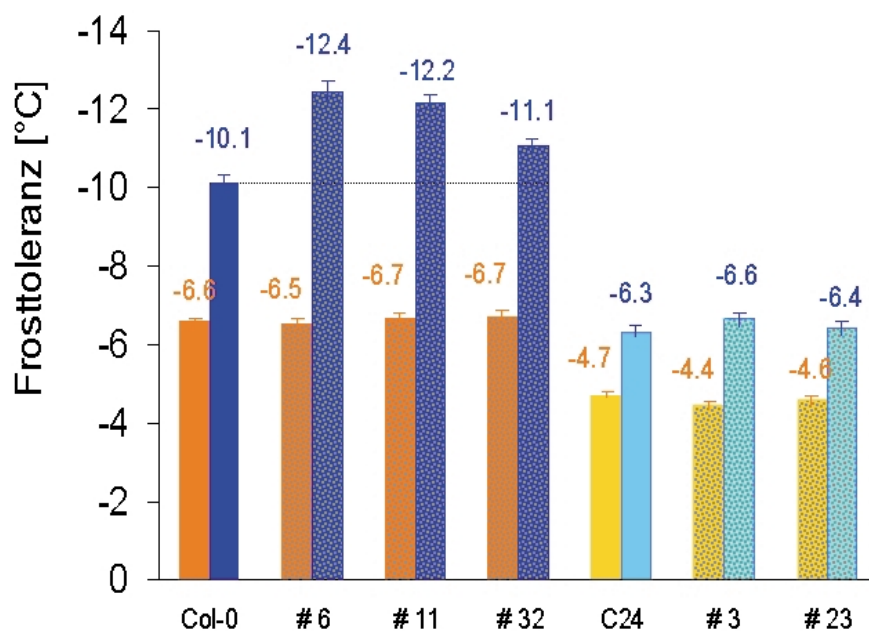


Abb. 13: Steigerung der Saccharosegehalte durch Inhibition der vakuolären Invertase führt im frosttoleranten Genotyp Col-0 zu einer Verbesserung der Toleranz, nicht aber im sensitiven Genotyp C24. Akklimatisierte Columbia-Pflanzen sind dunkelblau dargestellt, nicht akklimatisierte orange. Verschiedene transgene Pflanzen mit reduzierter Invertase-Aktivität sind mit Nummern bezeichnet, die Balken sind gemustert. Entsprechend wurde bei C24 verfahren. Hier sind nicht akklimatisierte Pflanzen gelb, akklimatisierte hellblau wiedergegeben. Die Zahlenangaben beziehen sich auf die Lethaltemperatur₅₀.

ben wir die Veränderung der Expression aller 24.000 Gene in der Kälte aufgezeichnet. Wir haben eine Datenbank angelegt, die unsere eigenen Untersuchungen und die Untersuchungen anderer Forschergruppen beinhaltet und dabei berücksichtigt, wie lange die Pflanzen jeweils der Kälte ausgesetzt waren. Das Ergebnis war erstaunlich: über 7.000 Gene, also etwa ein Drittel, wird durch die Behandlung bei vier Grad betroffen, wobei etwa gleiche Anzahlen induziert beziehungsweise reprimiert werden (Hannah et al., 2005). Die Umstellung ist also massiv! Aber was ist einfach nur eine Folge geänderter Umweltbedingungen und was Ursache für die Zunahme der Toleranz? Bei über 7.000 Kandidatengenen ist es durchaus schwierig, dieser Frage nachzugehen, zumal nicht klar ist, wie groß die Beiträge einzelner Genprodukte zur Gesamteigenschaft sind.

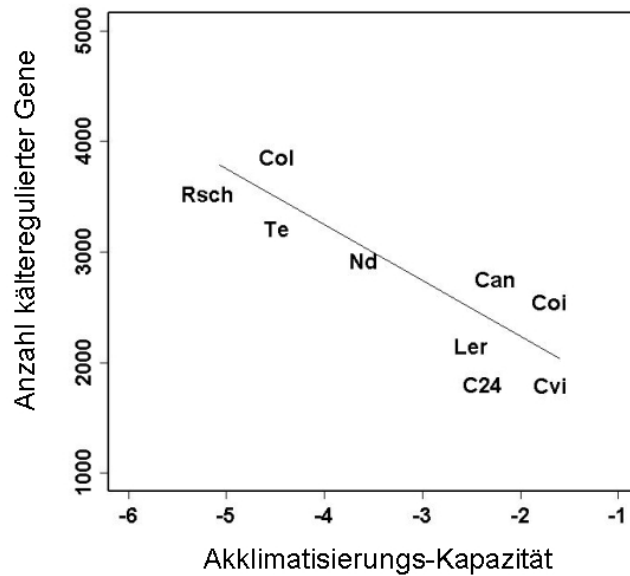


Abb. 15: Für neun verschiedene Ökotypen von *Arabidopsis* lässt sich ein Zusammenhang zwischen der Anzahl kältere regulierter Gene und der Frosttoleranz nachweisen. Das deutet darauf hin, dass die Änderung der Expression bei einer großen Anzahl von Genen in einem funktionellen Zusammenhang mit der Frosttoleranz steht.



Abb. 14 a: Als „Heterosis“ wird bezeichnet, wenn die Nachkommen einer Kreuzung (F 1) ihren beiden Eltern (P1 (links): Columbia; P2 (rechts): C24) überlegen sind. In der Landwirtschaft wird Heterosis zur Steigerung von Erträgen genutzt.

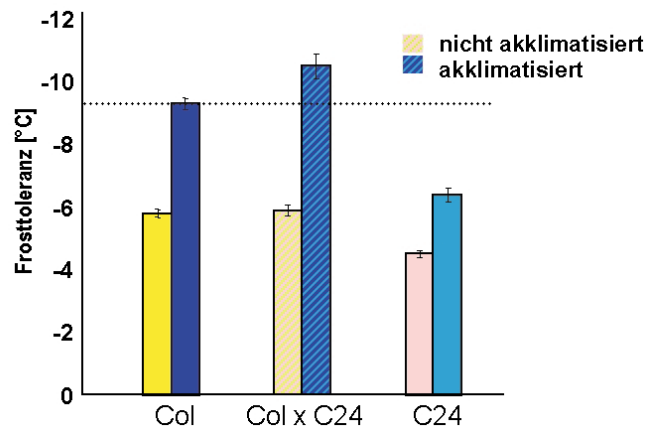


Abb. 14 b: Für die Eigenschaft Frosttoleranz konnte Heterosis erstmals in einer Kreuzung der Genotypen Columbia und C24 von *Arabidopsis* nachgewiesen werden. Die Nachkommen sind nach der Kälte-Akklimatisierung dem toleranteren Elternteil Columbia um ein Grad überlegen. Die Toleranz der akklimatisierten Pflanzen ist in dunkel- und hellblau, die der nicht akklimatisierten in gelb beziehungsweise rosa dargestellt.

Um zunächst einmal einen Überblick darüber zu erhalten, wie groß in etwa der Anteil der merkmalsbildenden Gene ist, haben wir die Genexpressionsstudien auf unsere gesamte Ökotypen-Sammlung erweitert. Nun können wir die Anzahl kältere regulierter Gene mit den Akklimatisierungskapazitäten der verschiedenen Ökotypen korrelieren und so abschätzen, ob der Umfang der Umstellung überhaupt etwas mit der Toleranzzunahme zu tun hat. Das ist tatsächlich der Fall: je toleranter ein Ökotyp ist, desto stärker reagiert er auf Temperaturänderungen (Abb. 15). Offensichtlich ist also eine große Zahl

von Genen in die Ausprägung des Toleranzmerkmals involviert. Welche Gene es nun tatsächlich sind, untersuchen wir derzeit mit Methoden der quantitativen Genetik. Hierzu verwenden wir eine Kreuzung des sensitiven Ökotyps C24 mit dem sehr toleranten Ökotyp Tenela. Aus der Nachkommenschaft der Kreuzung haben wir von 400 Individuen durch Selbstbefruchtung über sieben Generationen Inzuchtlinien erzeugt und können nun die Genloci ermitteln, die einen signifikanten Beitrag zur Toleranz leisten. Man nennt dieses Verfahren „QTL Mapping“ (*quantitative trait locus mapping*). Es liefert eine

Art „Landkarte“ des Genoms, auf der die wichtigsten Orte der Toleranzausbildung verzeichnet sind. Sobald wir diese Orte gefunden haben, können wir mit molekularen Methoden sozusagen dort hinreisen und untersuchen, was an diesen Orten tatsächlich geschieht.

Literatur

- Anchordoguy, T.J., Carpenter, J.F., Loomis, S.H., and Crowe, J.H. (1988). Mechanisms of interaction of amino acids with phospholipid bilayers during freezing. *Biochimica et Biophysica Acta* 946, 299-306
- Frings, E., Kunte, H.J., and Galinski, E.A. (1993). Compatible solutes in representatives of the genera *Brevibacterium* and *Corynebacterium*: Occurrence of tetrahydropyrimidines and glutamine. *FEMS Microbiology Letters* 109, 25-32
- Hannah, M., Heyer, A.G., and Hincha, D.K. (2005). A global survey of gene regulation during cold acclimation in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genetics in press*
- Hincha, D.K. and Schmitt, J.M. (1992). Freeze-thaw injury and cryopreservation of thylakoid membranes. In *Water and Life*, G.N. Somero, C.B. Osmond, and C.L. Bolis, eds. (Berlin: Springer), pp. 316-337
- Hincha, D.K., Zuther, E., Hellwege, E.M., and Heyer, A.G. (2002). Specific effects of fruct- and gluco-oligosaccharides in the preservation of liposomes during drying. *Glycobiology* 12, 103-110
- Hincha, D.K., Zuther, E., and Heyer, A.G. (2003). The preservation of liposomes by raffinose family oligosaccharides during drying is mediated by effects on fusion and lipid phase transitions. *Biochim Biophys Acta* 1612, 172-177
- Pigliucci, M. and Hayden, K. (2001). Phenotypic plasticity is the major determinant of changes in phenotypic integration in *Arabidopsis*. *New Phytologist* 152, 419-430
- Rohde, P., Hincha, D.K., and Heyer, A.G. (2004). 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. *Plant J* 38, 790-799
- Sharbel, T., Haubold, B., and Mitchell-Olds, T. (2000). Genetic isolation by distance in *Arabidopsis thaliana*: biogeography and postglacial colonization of Europe. *Molecular Ecology* 9, 2109-2118
- Steponkus, P.L. (1984). Role of the plasma membrane in freezing injury and cold acclimation. *Annual Review of Plant Physiology* 35, 543-584



Prof. Dr. Arnd G. Heyer

Nach dem Studium der Biochemie an der Eberhard Karls Universität Tübingen und an der Freien Universität Berlin promovierte der im Mai 1963 geborene Gießener 1991 über „Charakterisierung des Phytochromsystems von *Solanum tuberosum* an der FU Berlin. Im Juni 2001 habilitierte sich Arnd Heyer an der Universität Potsdam mit dem Thema „Molekularbiologische Ansätze zum Studium der Fruktansynthese“. Anschließend war er als Gruppenleiter am Max-Planck-Institut für Molekulare Pflanzenphysiologie in Golm bei Potsdam tätig. Seit April 2004 ist Arnd Heyer Professor für Botanik des Biologischen Instituts der Universität Stuttgart.

