



DGG-Proceedings, Vol. 6, 2016

Short Communications of the WeGa Network 2010-2015

Peer Reviewed

Editorial Board

Dirksmeyer, Walter *Braunschweig*
Flachowsky, Henryk *Dresden*
Förster, Nadja *Berlin*
Geyer, Martin *Potsdam*
Hardeweg, Bernd *Hannover*
Mibus-Schoppe, Heiko *Geisenheim*
Michaelis, Gerlinde *Bad-Zwischenahn*
Rath, Thomas (Editor in Chief) *Osnabrück*
Richter, Ellen *Braunschweig*
Thomas, Jens *Osnabrück*
Winkelmann, Traud *Hannover*
Zinkernagel, Jana *Geisenheim*

Uwe Drüge*, Martin Andreas Bauerfeind, Philipp Franken

Kühlereaktion von *Petunia hybrida* auf den Ebenen des Kohlenhydrathaushaltes,
der Phytohormonhomöostase und des Transkriptoms

*Corresponding Author:

Uwe Druege
Leibniz-Institut für Gemüse- und Zierpflanzenbau Großbeeren/Erfurt e.V.
Kühnhäuser Straße 101
99090 Erfurt,
Germany

Email: druege@erfurt.igzev.de

Kühlereaktion von *Petunia hybrida* auf den Ebenen des Kohlenhydrathaushaltes, der Phytohormonhomöostase und des Transkriptoms

Uwe Drüge, Martin Andreas Bauerfeind, Philipp Franken

Leibniz-Institut für Gemüse- und Zierpflanzenbau Großbeeren/Erfurt e.V.

1. Einleitung, Stand des Wissens, Zielsetzung

Im Rahmen des WeGa-Verbundprojektes "Wertschöpfungskette Zierpflanzen" war die Toleranz wärmeliebender Zierpflanzen gegen Kühlestress eine wichtige Zielgröße. Unter Kühlestress bzw. milden Kältestress verstehen wir die Belastung von Pflanzen durch Einwirkung sub-optimaler Temperaturen, die Wachstum und Entwicklung beeinträchtigt, aber nicht unbedingt zu Schadsymptomen führt. Der Einsatz von kühletoleranten Sorten würde die Reduktion der Heiztemperaturen im Winter ermöglichen und somit zur Energieeinsparung beitragen. Die Kühlereaktion von Pflanzen auf molekularer und physiologischer Ebene ist nur unzureichend verstanden. Bisher wurden vorrangig die Einflüsse niedriger Temperaturen nahe oder unterhalb des Gefrierpunktes untersucht. Kältestress verursacht eine Verschiebung der Relationen zwischen Kohlenhydratsynthese, -transport und -verbrauch (Hurry et al. 2000, Usadel et al. 2008). Dabei sind offenbar eine funktionsfähige Photosynthese sowie die Mobilisierung und der Transport von Zuckern wichtige Faktoren für die Kältetoleranz. Kältestress beeinflusst in hohem Maße den Phytohormonhaushalt. Dabei werden den Auxinen, insbesondere der Indol-3-essigsäure (IAA) sowie der Abscisinsäure (ABA) besondere Funktionen für die Anpassung an niedrige Temperaturen zugeschrieben (Ntatsi et al. 2013, Rahmann 2013).

Eine wesentliche Zielsetzung der Arbeit bestand darin, bei *Petunia hybrida* molekulare und physiologische Faktoren und Prozesse zu identifizieren, die bei einer Wachstumsbeeinträchtigung durch sub-optimale Temperaturen involviert sind. Im Weiteren sollte untersucht werden, ob tolerante Sorten im Vergleich zu kühesensitiven Sorten spezifische Reaktionsprofile aufweisen und sich hieraus endogene Faktoren bzw. Kandidatengene ableiten lassen, die möglicherweise die Kühletoleranz determinieren.

2. Material und Methoden

Unter Mitwirkung weiterer Verbundprojektpartner sowie des Praxispartners Selecta Klemm GmbH & Co.KG wurden geeignete Testsysteme zur Beurteilung der Kühletoleranz etabliert und die phänotypische Reaktion verschiedener Sorten auf kühle Temperaturen geprüft. Unter zwei Temperaturregimen (normal, kühl) wurde anschließend die Kühlereaktion einer empfindlichen Sorte analysiert. Zu verschiedenen Terminen nach Temperaturdifferenzierung wurden die Gehalte der Phytohormone IAA, ABA und Jasmonsäure mittels Gaschromatographie-Tandem-Massenspektrometrie (Varian Saturn 2200, CP-3800, Agilent, Santa Clara, USA) gemessen sowie die Kohlenhydrate Glucose (Glc), Fructose (Fru), Saccharose und Stärke und die Aktivität von Invertasen mittels enzymatischer Methoden bestimmt (Ahkami et al. 2013). Das Transkriptom wurde mittels

eines für *Petunia hybrida* entwickelten Microarrays analysiert (Breuillin et al. 2010). Es wurden drei verschiedene Organe beprobt, um das funktionelle Gleichgewicht des oberirdischen Teils der Pflanze beurteilen zu können. Neben den oberen voll entwickelten Blättern als Kohlenhydrat-Source-Organ wurde der Sprossapex als Wachstums-Sink sowie das oberste Internodium des Hauptsprosses untersucht. Weitere Details zur Durchführung der Experimente und angewendeten Methoden sind bei Bauerfeind et al. (2015) beschrieben. Ausgehend von den Ergebnissen der kühesensitiven Sorte wurde diese danach in einem prinzipiell gleich gestalteten Versuchsaufbau einer toleranten Sorte gegenüber gestellt. Untersuchungen zur Photosynthese wurden in einer weiteren Arbeit durchgeführt (Ergebnisse hier nicht dargestellt).

3. Ergebnisse

In mehreren Versuchen im Gewächshaus und unter Klimakammerbedingungen mit insgesamt 14 Petuniensorten erwies sich eine Tagesdurchschnittstemperatur von 12 °C (13 °C Tag/ 11 °C Nacht) gegenüber 16 °C (17 °C Tag/ 15 °C Nacht) als geeignet, um die unterschiedliche Wachstumsbeeinträchtigung der Sorten durch Kühlestress evaluieren zu können. Hierbei stellte sich der Zuwachs an Frisch- und Trockenmasse als am besten reproduzierbarer Wachstumsparameter heraus. Unter diesen Bedingungen wurde die Sorte 'Sweet Sunshine Williams' ('Williams') als kühesensitiv und die Sorte 'Ultra Blue' als kühetolerant identifiziert.

Die Sorte 'Williams' zeigte sehr komplexe Reaktionen des Kohlenhydrathaushaltes, der Phytohormonhomöostase und des Transkriptoms (Bauerfeind et al. 2015). In den Source-Blättern akkumulierten die Zucker frühzeitig nach Beginn der Kühlphase und blieben danach kontinuierlich auf einem hohen Niveau (Beispiel Hexosen in Abb. 1a). Demgegenüber war die Akkumulation der Zucker im Apex weniger stark ausgeprägt und zeitlich begrenzt (Abb. 1b). Nach zwei Wochen kehrte sich die Situation um. Ab 21 Tagen nach Temperaturdifferenzierung wiesen die Kontrollen signifikant höhere Hexose- und Stärkekonzentrationen im Apex auf als die kühl kultivierten Pflanzen.

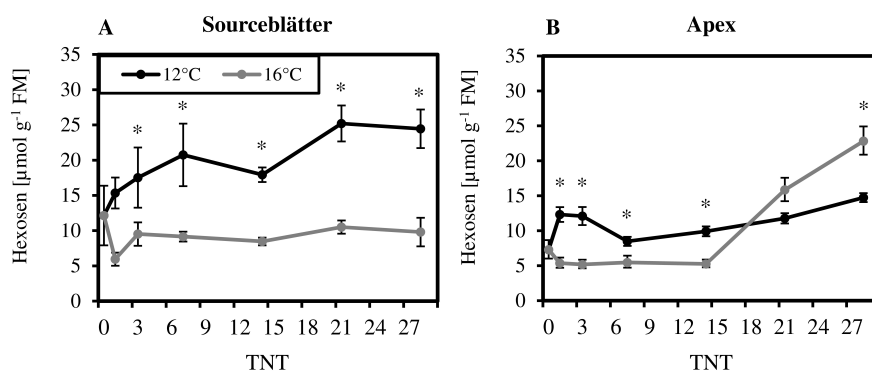


Abb. 1. Einfluss sub-optimaler Temperatur auf die Konzentrationen an Hexosen (Glu+Fru) A) in den Source-Blättern und B) im Sprossapex. TNT, Tage nach Temperaturdifferenzierung, Sterne markieren einen signifikanten Einfluss der Temperatur ($p \leq 0,05$, $n = 12$), nach Bauerfeind et al. (2015).

Die Kühlreaktion der Kohlenhydrate war mit einer niedrigeren Aktivität des

Saccharose-spaltenden Enzyms Invertase im Cytoplasma und insbesondere in der Zellwand verbunden (Bauerfeind et al. 2015). Die Konzentrationen der Phytohormone ABA und IAA zeigten in den ersten Tagen nach Kühleinwirkung kurzzeitige, vorübergehende Reaktionen in den Sourceblättern und im Internodium (Bauerfeind et al. 2015). Eine längere Kühleexposition hingegen führte zu signifikant niedrigeren ABA- und IAA-Konzentrationen im Sprossapex (Abb. 2).

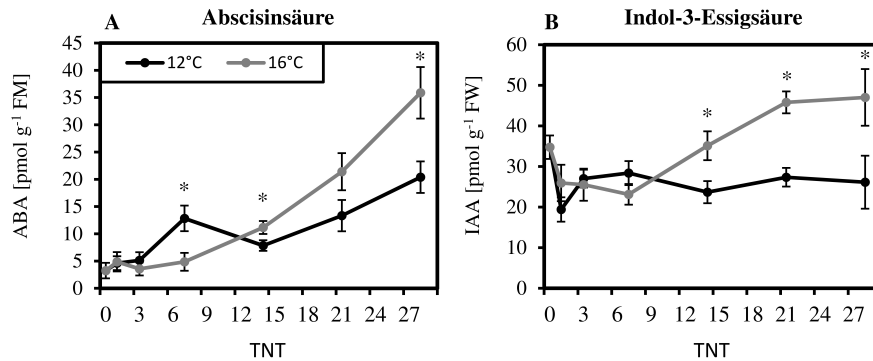


Abb. 2. Einfluss sub-optimaler Temperatur auf die Konzentrationen an A) Abscisinsäure und B) Indol-3-essigsäure im Sprossapex. TNT, Tage nach Temperaturdifferenzierung, Sterne markieren einen signifikanten Einfluss der Temperatur ($p \leq 0,05$, $n = 10$), nach Bauerfeind et al. (2015).

Die Transkriptomuntersuchungen zeigten ebenfalls eine phasen- und organabhängige Kühlereaktion (Abb. 3). Während der ersten drei Tage nach Kühleexposition wurden je nach Gewebe bis ca. 140 Gene differenziert exprimiert (hoch- oder herunter-reguliert). An Tag 7 sank die Zahl der differenziert exprimierten Gene, um danach wieder auf ein hohes Niveau anzusteigen.

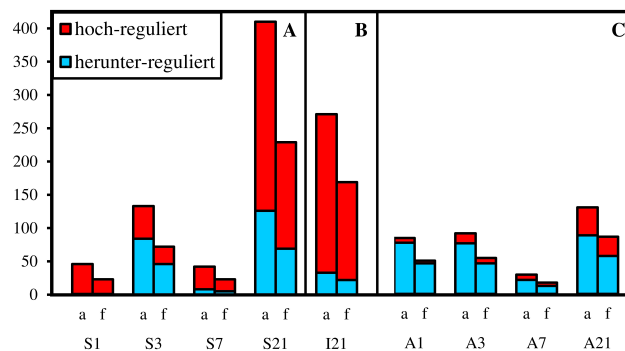


Abb. 3. Anzahl der unter Kühlestress differenziert exprimierten Gene zu unterschiedlichen Terminen nach Beginn der Temperaturdifferenzierung (Tag 1, 3, 7, 21). A) in den Source-Blättern (S1, S3, S7, S21), B) im Internodium (I21) und C) im Sprossapex (A1, A3, A7, A21). a, alle Sequenzen, f, Sequenzen mit zugeordneter Funktion. Details siehe Bauerfeind et al. (2015).

Hierbei wurden in den Source-Blättern die meisten Gene hoch-reguliert, im Apex dagegen reprimiert (Abb 3a, c). Besonders betroffen von dieser gegenläufigen Reaktion waren die funktionellen Gruppen „Biotische Stimuli“, „Abiotische Stimuli“ und „Ethylenmetabolismus“ (Abb. 4)

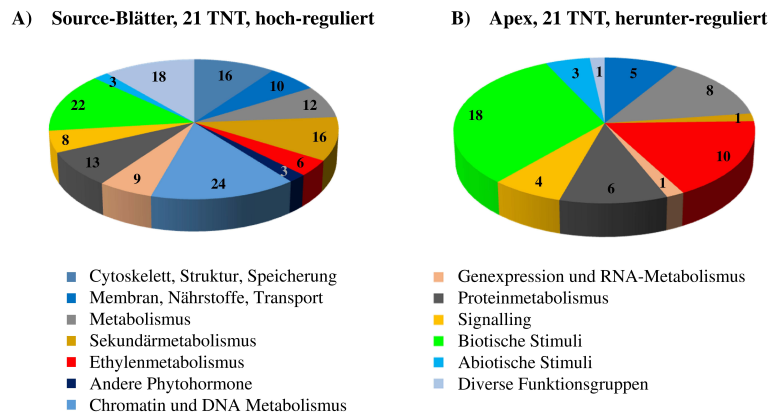


Abb. 4. Anzahl differenziert exprimierter Gene verschiedener Funktionsgruppen nach 21 Tagen unter Kühlstress. A) in Source-Blättern und B) im Apex. Details siehe Bauerfeind et al. (2015).

Bei dem Sortenvergleich war der Anstieg der Kohlenhydrate unter Kühle in den Source-Blättern der tolerante Sorte ‘Ultra Blue’ weniger stark ausgeprägt als bei ‘Williams’. Dem gegenüber wies die tolerante Sorte im Apex wesentlich höhere Saccharosekonzentrationen als die sensitive Sorte auf. Unabhängig von der Temperatur wurden im Apex von ‘Ultra Blue’ höhere ABA-Konzentrationen gemessen. Erste Auswertungen der Transkriptomdaten zeigen, dass bei der toleranten Sorte deutlich mehr Gene im Apex reguliert werden als bei der kühesensitiven Sorte.

4. Diskussion

Die phasen- und organspezifischen Kühlreaktionen der sensitiven Sorte ‘Williams’ belegen eine sehr komplexe Störung der Gesamtfunktion der Pflanze. Die starke und nachhaltige Zuckerakkumulation in den Sourceblättern ist eine für andere Pflanzenarten beschriebene Reaktion auf niedrige Temperaturen, die z.B. über Veränderung des osmolytischen Potentials zu einer Kältetoleranz der betroffenen Zellen beitragen kann (Mahajan and Tutejy 2005). Ob solche Schutzmechanismen unter den moderaten Temperaturen bei Petunien zum Tragen kommen, ist jedoch fraglich. Die relative Unterversorgung des Sprossapex mit Hexosen und Stärke nach längerer Kühle einwirkung deutet jedoch darauf hin, dass auf Dauer die Translokation der Kohlenhydrate in die Wachstumszentren beeinträchtigt ist. Die insbesondere im Apex reduzierte Invertaseaktivität, die mit einer reduzierten Expression der codierenden Gene einherging (Bauerfeind et al. 2015) könnte dazu beitragen, dass über eine verminderte Sink-Aktivität der Kohlenhydratantransport und das Wachstum unter Kühle beeinträchtigt sind (Gibeaut et al. 1990). Jedoch können auch andere Enzyme, Transportproteine oder Beeinträchtigungen z.B. des symplastischen Saccharosetransportes (Sowiński et al. 2001)

involviert sein. Die geringere Zuckerakkumulation in den Source-Blättern und gleichzeitig höheren Saccharosekonzentration im Apex der toleranten Sorte deuten darauf hin, dass hier der Kohlenhydrattransport unter Kühle besser funktioniert. Die Toleranz von Tomate gegenüber sub-optimalen Temperaturen wurde durch eine Beeinträchtigung der ABA-Synthese reduziert, wobei die Autoren eine indirekte ABA-Wirkung über die Ethylenbiosynthese vermuten (Ntatsi et al. 2013). Ob die höheren ABA-Gehalte der toleranten Petuniesorte eine Funktion bei der Kühltoleranz haben, müssen weitere Untersuchungen zeigen. Die sehr komplexen Veränderungen des Transkriptoms unter Kühleinfluss, die auch viele bei der Stressantwort von *Arabidopsis* involvierte Transkriptionsfaktoren betreffen (Bauerfeind et al. 2015), deuten im Kontext der metabolischen Reaktionen darauf hin, dass die Toleranz gegen Kühlestress bzw. milden Kältestress durch das Zusammenspiel vieler Gene und auch auf post-transkriptioneller Ebene reguliert wird.

5. Schlussfolgerung

Die Ergebnisse zeigen, dass Kühlestress in Folge der Absenkung der Temperatur um 4 K bei Petunie zu einer Störung der pflanzlichen Gesamtfunktion auf den Ebenen des Kohlenhydrathaushaltes, der Phytohormone und des Transkriptoms führt. Die Reaktionen lassen sich nach Bauerfeind et al. (2015) hierbei drei Phasen zuordnen: Störung (Tag 1 - 3), Erholung (Tag 7 - 14), Stabilisierung (ab Tag 21). Die gegensätzliche Reaktion der Expression vieler Gene und des Kohlenhydratstoffwechsels zwischen Source-Blättern und dem Sprossapex bei der empfindlichen Sorte deutet darauf hin, dass deren Stoffwechsel einer primären Verteidigungsstrategie für die Source-Organe folgt und dies durch eine Wachstumsbeeinträchtigung erkauft wird (Bauerfeind et al. 2015).

6. Literatur

- Ahkami, A. H., Melzer, M., Ghaffari, M. R., Pollmann, S., Ghorbani Javid, M., Shahinnia, F., Hajirezaei, M. R., and Druège, U. (2013). *Planta* 238, 499–517.
- Bauerfeind, M.A., Winkelmann, T., Franken, P., and Druège, U. (2015). *Frontiers in Plant Science*, DOI:10.3389/fpls.2015.00583.
- Breullin, F., Schramm, J., Hajirezaei, M., Ahkami, A., Favre, P., Druège, U., Hause, B., Bucher, M., Kretschmar, T., Bossolini, E., Kuhlemeier, C., Martinoia, E., Franken, P., Scholz, U. and Reinhardt, D.(2010). *Plant J.* 64, 1002–1017.
- Gibeaut, D. M., Karuppiyah, N., Chang S.-R., Brock, T. G., Vadlamudi, B., Kim, D., Ghosheh, N. S., Rayle, D. L., Carpita, N. C., and Kaufman, P. B. (1990). *Plant Physiol.* 94, 411–416.
- Hurry, V., Strand, Å., Furbank, R., and Stitt, M. (2000). *Plant J.* 24, 383–396.
- Mahajan, S., and Tuteja, N. (2005). *Arch. Biochem. Biophys.* 444, 139–158.
- Ntatsi, G., Savvas, D., Druège, U., and Schwarz, D. (2013). *Sci. Hortic.* 149, 28–38.
- Rahman, A. (2013). *Physiol. Plant.* 147, 28–35.
- Sowiński, P., Rudzińska-Langwald, A., Dalbiak, A., and Sowińska, A. (2001). *Plant Physiol. Biochem.* doi:10.1016/S0981-9428(01)01302-X.
- Usadel, B., Bläsing, O. E., Gibon, Y., Poree, F., Höhne, M., Günter, M., Trethewey, R., Kamlage, B., Poorter, H., and Stitt, M. (2008). *Plant. Cell Environ.* 31, 518–547.