

Kontrolliert unter Stress

Durch den Klimawandel geraten Bäume immer stärker unter Stress. Insbesondere lang anhaltende, intensive Trockenheit setzt vielen Baumarten zu. Aber wie reagieren Bäume auf Stress? Und wie können Unterschiede in der Stressreaktion zwischen Herkünften oder Nachkommenschaften ermittelt werden? Unter kontrollierten Bedingungen lassen sich mit invasiven und nicht invasiven Methoden viele Messwerte erfassen, mit deren Hilfe die Stressreaktion verfolgt werden kann.

TEXT: ALEXANDER FENDEL, TOBIAS BRÜGMANN



Abb. 1: Im Gewächshaus werden junge Pappeln im Trockenstressversuch mit Wassermangel konfrontiert.

In der Kulturpflanzenforschung sind Stressversuche unter kontrollierten Bedingungen eine etablierte Methode. Anhand der Ergebnisse aus Stressversuchen lässt sich überprüfen, ob die Züchtung von Kulturpflanzen den gewünschten Erfolg zeigt: Für die Anpassung an den Klimawandel werden beispielsweise Getreidesorten gezüchtet, die eine mangelnde Wasserversorgung aushalten können oder die widerstandsfähiger gegenüber Krankheitserregern sind. Diese Züchtungsziele sind auch im forstlichen Bereich relevant, allerdings sind hier molekularbiologische Ansätze noch unüblich. Dabei lassen sich die Methoden der Kulturpflanzenforschung oftmals auf Bäume übertragen.

Von der Forschungsgruppe „Genetische Technologien“ am Thünen-Institut für Forstgenetik in Großhansdorf werden in Gewächshäusern Stressexperimente mit Pappeln durchgeführt. Die Versuchsbäume werden mit Wassermangel

konfrontiert, um dann mit verschiedenen Messinstrumenten und Labormethoden ihre physiologische Reaktion auf den Stress und davon abgeleitet ihre Trockenstresstoleranz zu ermitteln. Die Untersuchungen werden mit Pappeln durchgeführt, weil sie besonders schnell wachsen und im Labor vegetativ vermehrt werden können. Die Methoden eignen sich auch für andere Baumarten. Je nach Fragestellungen lassen sich die Nachkommen bestimmter Kreuzungen oder sogar vegetativ vermehrte Klone verwenden.

Stressversuche im Gewächshaus sind eine passende Ergänzung zu Freilandversuchen. In Gewächshäusern kann zwar nur mit jungen Pflanzen über einen begrenzten Zeitraum gearbeitet werden, allerdings können sie hier unter kontrollierten Bedingungen kultiviert und detailliert untersucht werden (Abb. 1).

Gleiche Bedingungen für alle Bäume

Die Bäume in einem Trockenstressversuch sollten in mindestens zwei Gruppen unterteilt werden: „Stress“ und „Kontrolle“. Die Bäume der Kontrollgruppe werden ausreichend mit Wasser versorgt. Die Bäume der Stressgruppe werden einem Wassermangel ausgesetzt, idealerweise auch unterschiedlichen Stressintensitäten.

Die klimatischen Bedingungen innerhalb der Gewächshäuser, die Zusammensetzung und Menge der verwendeten Erde sowie die Größe der Versuchspflanzen bestimmen die Bewässerungsmenge am Tag, um die festgelegten Stressintensitäten zu erreichen. Da diese Faktoren schwer kalkulierbar sind, sollte der Bodenwassergehalt stetig mit einem Boden-

Schneller Überblick

- » Ob ein Baum durch Trockenheit gestresst ist oder nicht, lässt sich anhand vieler morphologischer, physiologischer, biochemischer und genetischer Parameter ermitteln
- » Diese Methoden werden derzeit vor allem in der Forschung genutzt, um das Wissen zu den Mechanismen der Trockenstresstoleranz zu erweitern
- » Stressversuche unter kontrollierten Bedingungen und eine tief greifende Phänotypisierung lassen Rückschlüsse zu, ob einzelne Bäume aus dem Wald oder aus einer Nachkommenschaft Anpassungen zeigen, die im Klimawandel nützlich sein können

feuchtesensor überwacht und mögliche Unterschiede in der Wasserversorgung der Pflanzen ausgeglichen werden. Die einheitliche Bewässerung aller Versuchsbäume innerhalb einer Gruppe ist oberstes Gebot: Nur wenn allen Bäumen einer Gruppe die gleiche Menge Wasser zur Verfügung steht, ist ein Vergleich der Pflanzen möglich.

Die Anordnung der Pflanzen auf der Fläche des Stressversuchs spielt eine wesentliche Rolle, da an unterschiedlichen Plätzen unterschiedliche Kultivierungsbedingungen herrschen können. Beispielsweise können die Pflanzen je nach Tageszeit mehr oder weniger Licht bekommen oder die Bewässerung kann von Pflanze zu Pflanze abweichen – auch unbemerkt. Daher werden die Pflanzen in zufälliger Anordnung (randomisiert) platziert. Das macht zwar die Datenerhebung und die Betreuung der Pflanzen (Prüfen des richtigen Wasserrégimes usw.) komplizierter, allerdings ist die Randomisierung für reproduzierbare Ergebnisse unabdingbar. Um weitere, nicht kalkulierbare Unterschiede in der Wasserversorgung gering zu halten, sollten die verwendeten Pflanzen entwicklungsphysiologisch und phänotypisch homogen sein. Um Standorteffekte auf am Außenrand des Versuchs stehende Pflanzen zu reduzieren, können Randpflanzen eingesetzt werden.

Um in einem Stressversuch einen Effekt nachweisen zu können, ist es notwendig, eine statistisch valide Aussage zu treffen. Das bedeutet, dass die Messergebnisse von einer Testgruppe (unter Stress) und einer Kontrollgruppe (ohne Stress) statistisch signifikante Abweichungen voneinander aufweisen. Im Allgemeinen wird dabei die Irrtumswahrscheinlichkeit herangezogen, die für signifikante Abweichungen unter dem Grenzwert von 0,05 liegen sollte. Je nach dem gewählten statistischen Auswerteverfahren wird ein gewisser Stichprobenumfang benötigt.

Mit Messdaten die Stressbelastung erfassen

Bereits während des laufenden Stressversuchs, aber auch danach, werden Messda-

„Mit dem fort-schreitenden Klimawandel rückt die Trockenstress-toleranz als Züchtungsziel bei Pflanzen, inklusive Forst- und Obstgehölzen, immer stärker in den Fokus.“

ALEXANDER FENDEL

ten erhoben. Diese sogenannte Phänotypisierung kann invasiv und nicht invasiv bzw. morphologisch, physiologisch, biochemisch und genetisch vorgenommen werden. Um ein genaues Bild der Trockenstresstoleranz zu erhalten, sollten möglichst viele Parameter überprüft werden (Tab. 1). Alle Ergebnisse sind alleinstehend nicht aussagekräftig, weil die absoluten Messwerte z. B. von der Pflanzenart, dem Entwicklungsstand und den Kultivierungsbedingungen abhängig sind. Die Ergebnisse sind daher immer im Vergleich zwischen den Gruppen „Stress“ und „Kontrolle“ zu betrachten.

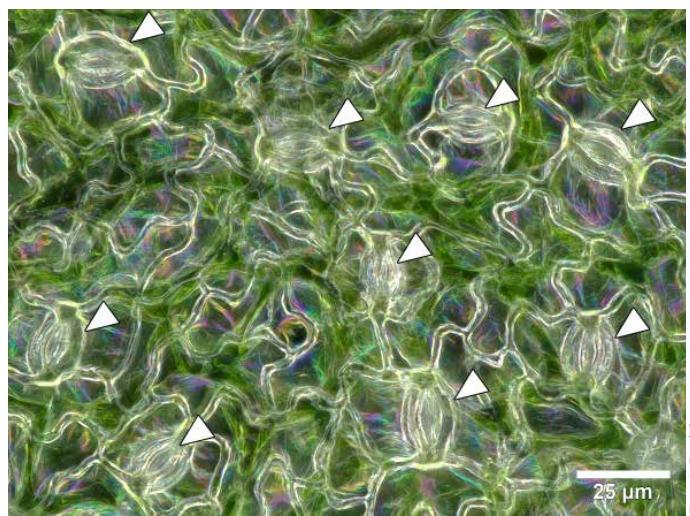


Abb. 2: In dieser mikroskopischen Aufnahme der Unterseite eines Pappelblatts sind die Spaltöffnungen (Stomata) mit weißen Pfeilen markiert. Über die Stomata in den Blättern findet der Gasaustausch statt. Auch Wasser verdunstet durch diese Öffnungen, sodass sie als Stressreaktion geschlossen werden, um den Wasserverlust zu minimieren.

Nicht invasive Phänotypisierung

Nicht invasive Phänotypisierungsmethoden haben den Vorteil, dass die Messdaten ohne Materialentnahme erhoben werden können und die Pflanzen nicht geschädigt und daher im Wachstum nicht beeinflusst werden.

Eine **morphologische Kerngröße** ist das Wachstum der Versuchspflanzen: Wachsen die Pflanzen unter Wassermangel schlechter oder ist ihr Wachstum davon unbeeinflusst? Neben der Sprosshöhe und dem Sprossdurchmesser lassen sich weitere Parameter, wie die Größe und Anzahl der neu gebildeten Blätter, erfassen. In der Kulturpflanzenforschung ist auch die Vermessung von Wurzeln, teilweise mit computergestützten Scans, etabliert.

Stomata sind die Spaltöffnungen innerhalb der Epidermis von Blättern. Sie ermöglichen den Gasaustausch, also die Abgabe von Sauerstoff und Wasserdampf sowie die Aufnahme von Kohlenstoffdioxid (Abb. 2). Unter Trockenstress reagieren Pflanzen mit dem Schließen der Stomata, um übermäßig Wasserverlust durch Verdunstung zu minimieren. Die Reaktionsgeschwindigkeit und der Bewegungsumfang der Stomata sind zwischen den Pflanzenarten unterschiedlich ausgeprägt. Der Öffnungsgrad der Stomata wird anhand der **stomatären Leitfähigkeit** mit Blatt-Porometern ermittelt. Eine niedrige stomatäre Leitfähigkeit bedeutet, dass die Stomata geschlossen wurden, was auf eine höhere Trockenstress-toleranz und eine effiziente Wassernutzung hinweisen kann.

Die **Chlorophyllfluoreszenz** lässt sich mit einem Fluorometer messen. Dahinter verbirgt sich ein komplexer biophysikalischer Vorgang: Die Chlorophyllfluoreszenz tritt auf, wenn Licht auf die Chloroplasten der Blattzellen trifft, allerdings nicht für die Fotosynthese genutzt werden kann. Dann wird das aufgefangene Licht wieder abgestrahlt. Die Blätter der Pflanzen leuchten gewissermaßen, was allerdings mit bloßem Auge nicht zu erkennen ist. Wenn Pflanzen unter Stress stehen und deswegen die Fotosynthese gedrosselt ist, nimmt die Chlorophyllfluoreszenz zu.

Daher kann die Messung der Fluoreszenz als Indikator für den Trockenstress dienen, da sie auf Veränderungen in der Fotosyntheseleistung hinweist.

Blattpigmente können zwar in einer Laboruntersuchung isoliert und dann quantitativ gemessen werden, allerdings müssen hierfür von den Pflanzen Blätter geerntet werden. Um eine Materialentnahme während des Versuchs zu vermeiden, werden Methoden zur nicht invasiven Messung bevorzugt. Zu den Blattpigmenten gehören Chlorophyll a und b, Carotinoide, Flavonole und Anthocyane, die sich mit handlichen Pigmentscannern messen lassen. Ein verringelter Chlorophyllgehalt in Blättern steht in direktem Zusammenhang mit der durch Stress reduzierten Fotosyntheseaktivität und ist daher ein Indikator für gestresste Pflanzen. Im Gegensatz dazu reichern sich Carotinoide, Flavonole und Anthocyane in den Blättern an [1]. Sie wirken antioxidativ und haben damit eine Zellschutzfunktion.

Eine innovative Form der nicht invasiven Phänotypisierung sind Drohnenaufnahmen mit **Multispektralkameras**. Damit lassen sich in kurzer Zeit viele Bäume, sogar in einem geschlossenen Bestand, phänotypisieren. Die Kamera nimmt dabei die Lichtspektren auf, die an physiologische Prozesse gekoppelt sind. Mit einem Drohnenflug lässt sich so beispielsweise der Wassergehalt in Blättern ermitteln [2].

Ausgewählte Messgrößen

Tab. 1: Auswahl von Messgrößen, die durch nicht invasive und invasive Phänotypisierungsmethoden erhoben werden können.

Untersuchung	Nicht invasive Phänotypisierung	Invasive Phänotypisierung
Morphologisch	Sprosshöhe und -durchmesser Verzweigungsgrad Anzahl und Größe der Blätter Blattwelke Wurzellänge	Anzahl der Stomata
Physiologisch	Stomatäre Leitfähigkeit Fotosyntheseaktivität Chlorophyllfluoreszenz Transpiration	Wasserpotenzial
Biochemisch	Gehalt der Blattpigmente	Gehalt an Stickstoff, Kohlenstoff, Prolin, Malondialdehyd, Abscisinsäure, Wasserstoffperoxid Relativer Blattwassergehalt
Genetisch		Genomanalysen Analyse einzelner Gensequenzen Genexpressionsanalysen



Abb. 3: Mit der als Scholanderbombe bezeichneten Druckkammer wird das Wasserpotenzial bestimmt. Indem der Druck in der Kammer erhöht wird, wird Wasser aus einem eingespannten Blattstiel herausgepresst.

Invasive Phänotypisierung

Invasive Messmethoden geben besonders genaue Rückschlüsse über das „Innenleben“ der Bäume, allerdings muss diesen dafür Material entnommen werden.

Durch die **Spaltöffnungen** finden maßgeblich die Verdunstung und der Gasaustausch statt. Die Anzahl der Spaltöffnungen ist in vorhandenen Blättern unveränderlich. Daher ist es interessant, ob an neugebildeten Blättern unter Stressbedingungen eine veränderte Anzahl pro Blattfläche zu finden

ist. Diese optische Analysemethode ist allerdings invasiv: Spaltöffnungen werden von zwei Schließzellen eingeraumt. Sie sind mit bloßem Auge nicht zu erkennen. Deswegen muss entweder ein Blatt entnommen oder ein Abdruck des Blattes erstellt werden, um die Stomata mithilfe der Vergrößerung eines Mikroskops auszuzählen (Abb. 2).

Das **Wasserpotenzial** gibt an, wie stark Wasser in einer Pflanze gebunden ist. Es wird mit einer sogenannten Scholander-Bombe gemessen (Abb. 3). In diese Druckkammer wird ein Blatt eingespannt und über eine kontinuierliche Erhöhung des Kammerdrucks wird ermittelt, wie viel Druck erforderlich ist, um Wasser aus dem Blattstiel herauszupressen. Dieses Druckpotenzial steht in umgekehrtem Verhältnis zum Wasserpotenzial. Daraus ergibt sich: Je höher der aufzuwendende Druck ist, umso mehr ist die Pflanze in der Lage, Wasser festzuhalten und Wasserverluste zu reduzieren.

Ob Bäume unter Trockenstress stehen, lässt sich biochemisch anhand von Molekülen untersuchen, die in den Zellen als Teil der Stressreaktion gebildet werden. Für die Detektion und Quantifizierung dieser Moleküle sind spezielle Labormethoden und Analysegeräte notwendig.

Abscisinsäure ist ein Pflanzenhormon, das ein Schlüsselmolekül in den Regulationsnetzwerken zur Steuerung von Stressreaktionen ist. Über Signalkaskaden sorgt das Hormon dafür, dass

die Spaltöffnungen geschlossen werden, wenn unter Trockenstress das Wasserpotenzial absinkt.

Wird aufgrund verschlossener Spaltöffnungen die Aufnahme von Kohlenstoffdioxid gehemmt, werden vermehrt sogenannte **reaktive Sauerstoffspezies** (ROS) gebildet. ROS sind sehr schädlich und können Pflanzenzellen zerstören. Am Anfang dieser Stressreaktion steht das als „freies Radikal“ bezeichnete Superoxidradikal, das sich allerdings nur sehr aufwendig direkt nachweisen lässt. Daher wird häufig das Folgeprodukt **Wasserstoffperoxid** (H_2O_2) bestimmt. Über die Bestimmung von **Malondialdehyd** kann zudem die durch ROS ausgelöste Degradation von Fetten ermittelt und oxidative Schädigungen festgestellt werden [3].

Die **Aminosäure Prolin** wird von Pflanzen unter Wassermangel verstärkt gebildet. Sie stabilisiert Zellstrukturen und dient als Puffer gegen die schädlichen ROS, wodurch die Aktivität von Enzymen aufrechterhalten wird. Höhere Prolinkonzentrationen deuten auf eine höhere Trockenstresstoleranz hin [4].

Unter Trockenstress wird häufig die gesamte Stoffwechselaktivität von Pflanzen gedrosselt, was einen geringeren **Kohlenstoff- und Stickstoffgehalt** zur Folge hat. Der Kohlenstoffgehalt ist an die Energiebereitstellung durch Kohlenhydrate gekoppelt. Der Stickstoffgehalt steht in Verbindung mit der Aufnahme von Stickstoff aus dem Boden

Literaturhinweise:

- [1] YANG, X.; LU, M.; WANG, Y., et al. (2021): Response Mechanism of Plants to Drought Stress. *Horticulturae* 7(3), 50.
- [2] THIEL, M.; RATH, T.; RUCKELSHAUSEN, A. (2012): Messung von Feuchtigkeitsvariationen bei Pflanzenblättern am Beispiel von Brokkoli auf Basis eines NIR Hyperspectral Imaging Systems. *Bornimer Agrartechnische Berichte*, 78.
- [3] HODGES, D.; DELONG, J.; FORNEY, C., et al. (1999): Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta* 207, 604–611.
- [4] KAUR, G.; ASTHIR, B. (2015): Proline: a key player in plant abiotic stress tolerance. *Biol Plant* 59, 609–619.
- [5] PFENNIGER, M.; REUSS, F.; KIEBLER, A., et al. (2021): Genomic basis for drought resistance in European beech forests threatened by climate change. *Elife*, 10, e65532.
- [6] ULLOA, J. L.; AGUAYO, P.; CONEJERA, D., et al. (2021): Transcriptomic response in foliar and root tissues of a drought-tolerant *Eucalyptus globulus* genotype under drought stress. *Trees*, 1–13.

und der Proteinbildung. Somit kann ein höherer Kohlenstoff- und Stickstoffgehalt auf eine gesteigerte Trockenstresstoleranz hindeuten.

Der Wassergehalt in Blättern variiert bei unterschiedlicher Wasserverfügbarkeit. Eine Messgröße ist der **relative Wassergehalt**, für dessen Berechnung drei Messgrößen benötigt werden, die mit einer feinen Waage ermittelt werden können. Für das Frischgewicht (FW) wird ein Blatt direkt nach der Ernte im frischen Zustand gewogen. Dann wird es für acht Stunden in Wasser gelegt, um das Turgorgewicht (TW) zu ermitteln, also die maximale Wasseraufnahmekapazität des Blatts. Anschließend wird es bei 80 °C getrocknet, um das Trockengewicht (DW) zu erhalten. Anhand der Formel $(FW - DW)/(TW - DW) \times 100$ ergibt sich der relative Wassergehalt. Ein hoher Wert zeigt an, dass das Blatt gut mit Wasser versorgt ist. Bei guter Wasserversorgung haben beispielsweise Pappelblätter einen Wassergehalt von 80 %. Bereits bei 50 % stehen sie stark unter Trockenstress.

Der Blick in die Gene

Genetische Analysen können eine ausschlagssreiche Ergänzung zu den physiologischen und biochemischen Analysen sein. Einerseits kann die Erbinformation (DNA) analysiert und Gene identifiziert werden, in denen Merkmale der Trockenstresstoleranz verschlüsselt sind. Innerhalb der DNA können Prädispositionen festgestellt werden, die Vorhersagen über Toleranzen ermöglichen. Beispielsweise wurden für die Rotbuche 70 Gen-Orte identifiziert, die eine Prognose hinsichtlich der Trockentoleranz ermöglichen [5]. Andererseits wird die Erbinformation nicht gleichförmig ausgeprägt (exprimiert). Die Expression von Genen ist abhängig von vielen Faktoren, darunter Gewebe, Alter, Tageszeit oder Stressfaktoren. Die Bestimmung der Genexpression, z. B. in Blättern unter Trockenstress und normaler Bewässerung, kann insbesondere die Fragen beantworten:

- Welche Gene werden unter Stress besonders stark aktiviert?
- Welche Gene werden herunterreguliert [6]?
- Wie schnell reagiert eine Pflanze auf Trockenstress?

Neben der Diagnostik, wie stark Bäume zum Analysezeitpunkt gestresst sind,

sind auch Vorhersagen über mögliche Toleranzen denkbar, indem aufgedeckt wird, welche Gene stressabhängig reguliert werden. Das stärkt das Verständnis für die genetischen Grundlagen von Trockenstresstoleranz.

Fazit und Zusammenfassung

Ob ein Baum durch Trockenheit gestresst ist oder nicht, lässt sich anhand vieler morphologischer, physiologischer, biochemischer und genetischer Parameter ermitteln. Diese Methoden werden derzeit vor allem in der Forschung genutzt, um das Wissen zu den Mechanismen der Trockenstresstoleranz zu erweitern, nicht zuletzt weil spezielle Geräte oder eine Laborausstattung benötigt werden.

Aber nicht nur für die Wissenschaft sind diese Analysen sinnvoll: Mit dem fortschreitenden Klimawandel rückt die Trockenstresstoleranz als Züchtungsziel bei Pflanzen, inklusive Forst- und Obstgehölzen, immer stärker in den Fokus. Stressversuche unter kontrollierten Bedingungen sowie eine tief greifende Phänotypisierung lassen nachfolgend Rückschlüsse zu, ob einzelne Bäume aus dem Wald oder aus einer Nachkommenschaft Anpassungen zeigen, die im Klimawandel nützlich sein können. Daher können diese Analysemethoden, die in der Kulturpflanzenzüchtung schon heute in der Praxis verwendet werden, zukünftig auch in die Forstpflanzenzüchtung Einzug halten.



Alexander Fendel

alexander.fendel@thuenen.de

ist Nutzpflanzenwissenschaftler und forscht für seine Doktorarbeit an der Trockenstresstoleranz von Pappeln und Rotbuchen am Thünen-Institut für Forstgenetik in Großhansdorf. **Dr. Tobias Brügmann** ist Leiter der Nachwuchsforschungsgruppe „Genetische Technologien“ am Thünen-Institut für Forstgenetik.