

Einfluss der Kreuzungsumgebung auf die Stressresistenz der  
Nachkommen von Fichte (*Picea abies* L. [Karst.]) und  
*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten  
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Constanze Blödner

aus Apolda

Göttingen 2005

D7

Referent: Frau Prof. Dr. Andrea Polle

Korreferent: Herr Prof. Dr. Christoph Leuschner

Tag der mündlichen Prüfung: 02.11.2005

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
1.1	Klimaänderung und Anpassungsvermögen.....	1
1.2	Die gemeine Fichte ( <i>Picea abies</i> L. [Kast.].....	3
1.3	<i>Arabidopsis</i> als Referenzpflanze.....	5
1.4	Genomisches Imprinting und maternale Effekte .....	5
1.5	Abiotischer Stress .....	11
1.6	Ziel dieser Arbeit .....	14
<b>2</b>	<b>MATERIAL.....</b>	<b>15</b>
2.1	Gemeine Fichte ( <i>Picea Abies</i> L. [Karst.]): Kreuzung und Anzucht .....	15
2.2	<i>Arabidopsis thaliana</i> (L.) Heynh. Kreuzung und Anzucht .....	18
<b>3</b>	<b>METHODEN.....</b>	<b>21</b>
3.1	Stressversuche.....	21
3.1.1	Trockenstress.....	21
3.1.2	Froststressversuche.....	22
3.1.3	Kältestressversuch.....	24
3.2	Ökophysiologische Parameter.....	25
3.2.1	Chlorophyllfluoreszenz .....	25
3.2.2	Wasserpotential .....	27
3.2.3	Bestimmung der Elektrolytleitfähigkeit .....	27
3.2.4	Ernte und Trockenmassebestimmung .....	27
3.2.5	Bestimmung des Samengewichts .....	28
3.2.6	Blattzuwachs .....	29
3.2.7	Wurzelwachstum .....	29
3.3	Biochemische Analysen.....	29
3.3.1	Herstellung von Rohextrakten und Gelfiltration .....	29
3.3.2	Proteinbestimmung.....	30
3.3.3	Bestimmung von Enzymaktivitäten .....	30
3.3.4	Eindimensionale Elektrophorese.....	32
3.3.5	Zweidimensionale Elektrophorese .....	34
3.3.6	C/N Analyse .....	39
3.3.7	Kohlenhydratbestimmung .....	40
3.3.8	Lipidbestimmung .....	41
3.4	Molekularbiologische Analysen .....	41
3.4.1	RNA-Isolierung.....	41
3.4.2	Filterhybridisierung.....	43

3.4.3	RNA Aufreinigung und cDNA Synthese .....	43
3.4.4	Real Time PCR.....	44
<b>3.5</b>	<b>Statistik.....</b>	<b>47</b>
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>48</b>
<b>4.1</b>	<b>Einfluss von Stress auf Fichtensämlinge aus verschiedenen Kreuzungsumgebungen .....</b>	<b>48</b>
4.1.1	Trockenstressexperiment 1 .....	48
4.1.2	Trockenstressexperiment 2.....	55
4.1.3	Froststressversuche.....	67
4.1.4	Froststressversuch 1 .....	67
4.1.5	Forststressexperimente 2 und 3 .....	70
<b>4.2</b>	<b>Arabidopsis thaliana .....</b>	<b>77</b>
4.2.1	Nährstoffanalyse der Samen.....	77
4.2.2	Keimung und Blattzuwachs .....	80
4.2.3	Wurzelwachstum .....	82
4.2.4	2-D-Elektrophorese .....	84
4.2.5	Kältestress .....	85
4.2.6	Genexpressionsanalysen.....	87
<b>5</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>92</b>
<b>5.1</b>	<b>Gemeine Fichte (Picea abies [Karst.] L.).....</b>	<b>92</b>
5.1.1	Reaktion der Nachkommen von Fichte verschiedener Kreuzungsumgebungen auf Froststress.....	92
5.1.2	Reaktion der Nachkommen verschiedener Kreuzungsumgebungen auf Trockenstress.....	96
5.1.3	Einfluss der Kreuzungsumgebung auf das Proteilmuster.....	101
5.1.4	Trockenstress bei zwei unterschiedlich frostresistenten Fichtenherkünften .....	101
<b>5.2</b>	<b>Arabidopsis thaliana (Ackerschmalwand).....</b>	<b>103</b>
5.2.1	Einfluss der Kreuzungsumgebung auf den Nährstoffgehalt beim Samen.....	103
5.2.2	Einfluss der Kreuzungsumgebung auf Keimung und Wachstum .....	106
5.2.3	Unterschiede in der Kältestressreaktion und in der Genexpression zwischen den Nachkommen aus den unterschiedlichen Kreuzungsumwelten.....	108
5.2.4	Schlussfolgerung und Ausblick.....	113
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>115</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>118</b>
<b>8</b>	<b>ANHANG.....</b>	<b>129</b>

## Abkürzungsverzeichnis

APS	Ammoniumpersulfat
BCA	Bichinonic-Acid
C/N Verhältnis	Kohlenstoff/Stickstoffverhältniss
Ca(OCl) <sub>2</sub>	Calciumhypochlorid
c-DNA	Circuläre DNA
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonat
CTAB	Cetyltrimethylammoniumchlorid
d	Tag
dd H <sub>2</sub> O	Doppeldestiliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DOC	Natriumdeoxycholat
DTT	1,4-Dithio-DL-threitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EST	Expressed Sequence Tags
FM	Frischmasse
GBB G-250	Commassiebrilliantblue
GuPOD	Guajakolperoxidase
h	Stunde
IPG-Puffer	Immobilized pH-Gradient Puffer
K	Kontrolle
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dikaliumhydrogenphosphat
kDa	Kilodalton
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat
KPP	Kaliumphosphatpuffer
LC-MS	Flüssigkeitschromatographie-Massenspektrometrie
min	Minute
MSDB	Mass Spektrometry protein sequence Data Base
MW	Molekulargewicht
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxyd
NCBIInr	National Center for Biotechnology Information
OEE-protein	oxygen evolving enhancer - Protein
PAR	photosynthetix active radiation = photosynthetisch aktive Strahlung
PCR	Polymerase chain reaction
PP-Röhrchen	Polypropylen-Röhrchen
PVPP	Polyvinylpolypyrrolidone
RNA	Ribonucleinsäure
Rubisco	Ribulosebisphosphatcarboxylase
S	Stress
SDS	Dodecylsulfat Natriumsalz
SOD	Superoxiddismutase
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	Tetramethylethylendiamin

VI

TM

Tris

Triton X-100

v/v

w/v

Trockenmasse

Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

Octylphenol-polyethylenglycol

Volumen/Volumen

weight/volume (Gewicht/Volumen)

## Chemikalienverzeichnis

Aceton	AppliChem, Darmstadt
Acetonitril	Fischer Scientific, Loughborough, GB
Acrylamid	biomol, Hamburg
Agarose	Cambrex, Rockland, USA
Agarose NA	Amersham
Ameisensäure	Merck, Darmstadt
Ammoniumbicarbonat	Sigma, Steinheim
Amyloglucosidase	Fluka, Buchs, Schweiz
Anthron	Sigma, Steinheim
APS	Sigma
BCA	Uptima, Montelucon, Frankreich
Beta-Fruktosidase	Roche, Mannheim
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Ca(OCl) <sub>2</sub>	Merck, Darmstadt
CHAPS	Fluka, Buchs, Schweiz
Chloroform	Merck, Darmstadt
CTAB	Roth, Karlsruhe
Cytochrom C	Sigma, Steinheim
Dikaliumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
DMSO	Merck, Darmstadt
DOC	Merck, Darmstadt
Dodecylsulfat Natriumsalz	Darmstadt Merck
Dry-Stripcoverfluid	Amersham
DTT	Sigma, Steinheim/ Fluka, Buchs, Schweiz
EDTA	Fluka, Buchs, Schweiz
Eisessing	Merck, Darmstadt
Ethanol	GeReSO mbH, Einbeck
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Folin-Ciocalteus Phenolreagenz	Merck, Darmstadt
Formaldahyd	Fluka, Buchs, Schweiz
GBB G-250	Serva, Heidelberg
Glycerol	Scharlau, Barcelona, Spanien
Glycin	Merck, Darmstadt
Guajakol	Fluka, Buchs, Schweiz
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Merck, Darmstadt
Harnstoff	KMF, Lohmar
Hexokinase/	
Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase	Roche, Mannheim
Iodacetamid	Fluka, Buchs, Schweiz
IPG-Puffer	Amersham
Isoamylalkohol	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Lithiumchlorid	Merck, Darmstadt
Mercathophethnol	Roth, Karlsruhe
Methanol	Roth, Karlsruhe
NaOH	Merck, Darmstadt
Natriumazid	Merck, Darmstadt
Natriumcarbonat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt

## VIII

Natriumthiosulfatpentahydrat	Merck, Darmstadt
ortho-Phosphorsäure	Merck, Darmstadt
Phosphoglucose Isomerase	Roche, Mannheim
Polyvinylpyrrolidone	Sigma, Steinheim
Schwefelsäure	Roth, Karlsruhe
Silbernitrat	Fluka, Buchs, Schweiz
TCA	Merck, Darmstadt
TEMED	Serva, Heidelberg
Thioharnstoff	Merck, Darmstadt
Tris	Merck, Darmstadt
Triton X-100	Merck, Darmstadt
Trypsin	Promega, Madison WI, USA
Xanthinoxidase	Sigma, Steinheim



# 1 Einleitung

## 1.1 Klimaänderung und Anpassungsvermögen

Verschiedene Klimaszenarien prognostizieren für die Zukunft unter anderem einen Anstieg des CO<sub>2</sub>-Gehaltes von 350 ppm auf 700 ppm (IPCC 2001a). Die verschiedenen Modelle zeigen auch einen Temperaturanstieg auf. Allerdings schwanken die Angaben über die erwartete globale Erwärmung zwischen 1°C und 3,6 °C beziehungsweise 5°C und 6 °C bis zum Jahr 2100 (Lindner und Cramer 2002). Dabei kann es zu regionalen Unterschieden kommen. Für Süd- und Nordwesteuropa (Finnland, Westrussland) wird ein jährlicher Temperaturanstieg zwischen 0,1 °C und 0,4 °C pro Dekade prognostiziert. Die Temperaturen sollen sich im Sommer im Süden Europas zwischen 0,2 bis 0,6 °C pro Dekade und im Norden um 0,08-0,3 °C erhöhen. Der Trend scheint dahin zu gehen, dass die Durchschnittstemperaturen in der nördlichen Hemisphäre steigen und damit Kälte- und Frostperioden verringert auftreten. Als Folge werden verlängerte Wachstumsperioden vorausgesagt (IPCC 2001a).

Bezüglich der Niederschläge werden für Europa zunächst generell erhöhte Niederschlagsmengen im ganzen Jahr prognostiziert (IPCC 2001a). Diese können aber innerhalb von kürzester Zeit in sehr großem Umfang und regional unterschiedlich fallen. Für die Sommermonate werden vor allen Dingen in Süd- und Osteuropa länger andauernde Dürreperioden erwartet.

In bezug auf das Klima in Deutschland wird je nach Modell eine Temperaturerhöhung von 1,6 bis 4,1 °C prognostiziert (Lindner und Cramer 2002). Die Niederschläge könnten sich während der Vegetationsperiode im Westen Deutschlands um 20-50 % erhöhen (Ostniedersächsisches Tiefland, Frankenalp und Oberpfälzer Jura) und im Osten verringern (Mittelbrandenburgisches Talsand- und Moränenland). Diese regionalen Unterschiede hatten sich schon in den letzten Jahrzehnten angedeutet (Rapp 2000). Es wird erwartet, dass aufgrund vermehrter und stärkerer Regenfälle auch in Deutschland Überschwemmungsereignisse zunehmen (Schönwiese 2003). Eine wichtige Frage ist daher, ob oder in welchem Maße unsere einheimischen Wälder durch diese Veränderungen beeinflusst werden. Laut IPCC-Bericht (2001a) werden terrestrische Systeme, u.a. auch die Wälder, Schäden durch langanhaltende Trockenperioden, Feuer, hohen Schädlingsbefall oder vermehrte Stürme erleiden. Dabei gelten Wälder als wichtiger Speicher für das ansteigende CO<sub>2</sub> in der Atmosphäre.

Organismen sind in der Lage, sich an veränderte Klimabedingungen anzupassen. Hierfür wurde der Begriff Adaptation angewendet. Der IPCC-Bericht (2001a) definierte Adaptation folgendermaßen: Adaptation ist die Anpassung eines ökologischen, sozialen oder ökonomischen Systems als Antwort auf aktuelle oder erwartete Klimaeinflüsse. Dabei kommt es zum Wandel in Prozessabläufen und von Strukturen innerhalb des Systems, um eine Schädigung abzuwehren oder zumindest abzumildern. Begon et al. (1998) unterscheidet drei unterschiedliche Bedeutungen des Begriffes Adaptation. Erstens sind es Merkmale von Organismen, die das Ergebnis der natürlichen Selektion während ihrer entwicklungsgeschichtlichen Vergangenheit sind und zu einem engen Verhältnis mit ihrer Umwelt führen und/oder den Organismus zwingen, in einem schmalen Spektrum von Umwelten zu leben. Zweitens bedeutet Adaptation Veränderungen in der Form oder im Verhalten eines Organismus während seines Lebenszyklus (Licht- und Schattenblätter oder Kältetoleranz). Drittens versteht man unter Adaptation auch die Änderung der Erregbarkeit eines Sinnesorgans infolge stetiger Stimulierung. Perez de la Vega (1996) definierte mit dem Begriff Adaptation das Vermögen eines Organismus in einer Kombination von Umwelteinflüssen zu leben und sich zu reproduzieren.

Sich verändernde Umweltbedingungen wirken sich auf die Biodiversität eines Ökosystems aus. Die Artenzusammensetzung und deren Dominanz können sich verändern (Leuschner und Schipka 2004). Bäume und Sträucher dringen weiter in Tundragebiete vor, und Laubbäume können in nördliche Koniferenbestände einwandern (IPCC 2001a). Wildarten reagieren auf sich verändernde Umweltbedingungen auf drei verschiedene Weisen: Zum einen mit einer sich verändernden geographischen Verbreitung, zum Zweiten mit genetischer oder plastischer Anpassung vor Ort oder drittens mit Aussterben. Im Falle einer Migration wird mit einer Verschiebung der Verbreitungsgebiete um mehrere hundert Kilometer polwärts pro 1 °C Temperaturänderung im Jahresdurchschnitt gerechnet (IPCC 2001b). Diese Verschiebung der Verbreitungsgebiete wird auch in Richtung höherer Lagen beobachtet, da die schneebedeckten Gebiete sich zurückziehen und auch permanente Frostzonen bis zum Ende des 21. Jahrhunderts möglicherweise verschwinden. So können weitere wichtige Habitate wie die Tundra, Feuchtgebiete oder die alpine Vegetation ganz verschwinden und damit die ausschließlich an diese Gebiete angepassten Spezies. Das Adaptationsvermögen natürlicher Systeme in Europa wird als gering eingeschätzt (IPCC 2001a).

## 1.2 Die gemeine Fichte (*Picea abies* L. [Kast.])

Die gemeine Fichte ist zusammen mit fünf weiteren Fichtenspezies (Engelmanns Fichte, Weiß-Fichte, Schwarzfichte, Rot-Fichte, Sitka-Fichte) von großem Interesse für die Waldwirtschaft auf der nördlichen Halbkugel (Grossnickle 2000). Sie ist eine wichtige und leistungsfähige Wirtschaftsholzart in Eurasien. Das Verbreitungsareal reicht von Mittel- nach Südosteuropa, wobei die Fichte über die Bergregionen (Balkan) stellenweise noch weiter nach Süden vorgedrungen ist. Weiterhin erstreckt sich das Verbreitungsgebiet im Nordosten Europas nach Skandinavien und in Richtung Asien bis Sibirien (Schmidt-Vogt 1977, Grossnickle 2000). Manche Autoren trennen hier aufgrund von morphologischen Unterschieden noch eine sibirische Form (*Picea obovata*) von der gemeinen Fichte (*Picea abies*) ab (Schmidt-Vogt 1977, Schütt 1992). Die Fichte hat als kontinentale Baumart einen geringen Temperaturbedarf. Sie ist eine flachwurzelnde Halbschattenholzart, die empfindlich gegen Trockenperioden ist (Schütt 1992). Zudem weist sie eine hohe Empfindlichkeit gegenüber Spätfrösten auf (Schmidt-Vogt 1977, Schütt 1992). Aufgrund des großen Verbreitungsareals haben sich bei der Fichte durch Anpassung an verschiedenste Standorte entsprechende Rassen und Ökotypen herausgebildet. In umfangreichen Studien Ende des vorletzten und Anfang des letzten Jahrhunderts sind diese verschiedenen Rassen national und international untersucht worden (Schmidt-Vogt 1977). Sie alle zeigen aufgrund ihrer Herkünfte unterschiedliches Wachstum, Knospenaustrieb zu verschiedenen Zeitpunkten oder verschiedene Resistenzen gegenüber Trockenheit. Einige dieser Untersuchungen beschäftigten sich mit der Frage der Adaptation. Dabei wurden Fichten unterschiedlicher Herkünfte an ein und demselben Standort angezogen. Anfängliche Unterschiede bezüglich der Wachstumsgeschwindigkeit wurden über die Jahre ausgeglichen, während Unterschiede hinsichtlich des Merkmals Schneebruchresistenz herkunftsbedingt erhalten blieben (Schmid-Vogt 1977).

Fichten werden im großen Stil angebaut. Statistische Erhebungen in den 90iger Jahren haben für Norwegen oder Schweden einen Anbau von 20 Millionen bzw. 195 Millionen Setzlingen jährlich ergeben. In Deutschland waren es bis zu 50 Millionen. Dabei spielen sogenannte Samen- oder Vermehrungsanlagen, wo die Setzlinge in Containern oder Gewächshäusern vorkultiviert werden, eine wichtige Rolle. Der Anteil der in Vermehrungsanlagen angezogenen Setzlinge macht in Skandinavien bis zu 85 % aus (Grossnickle 2000).

Im Zuge der Klimaerwärmung spielt die Adaptationsfähigkeit der Fichte eine wichtige Rolle. Es wurden Modellierungen mit einem virtuellen Fichtenbestand auf verschiedenen Standorten mit unterschiedlicher Jahrestemperatur und unterschiedlichem Niederschlag erstellt (Liesebach 2002). Die Laufzeit in diesen Modellen wurde mit 75 Jahren festgelegt. In dem einen Modell wurde eine natürliche Mortalität und in dem anderen eine Mortalität durch gezielte Durchforstung vorausgesetzt. Es war ein signifikanter Einfluss der simulierten Umwelten auf die Anzahl der Bäume, ihren Stammdurchmesser und ihrer Wuchshöhe, aber kaum ein Einfluss auf die genetische Variabilität (Liesebach 2002) zu erkennen. In einem weiteren Modell wurde der Einfluss einer Temperaturerhöhung von 1-3°C auf Fichte und Buche untersucht. Dieses Modell ergab im Trend, dass der Zuwachs sich mit steigender Temperatur verringert (Pretzsch and Dursky 2002). Ein durchschnittlicher Temperaturanstieg um 3 °C würde für die Fichte suboptimale Bedingungen bedeuten und damit Verluste in der Holzwirtschaft.

Ein erhöhter Kohlendioxidgehalt und eine höhere Durchschnittswintertemperatur verursachen in Fichten einen erhöhten Nadelverlust, der im folgenden Jahr zu reduziertem Wachstum führte (Skre und Nes 1996). Es wird auch damit gerechnet, dass aufgrund der steigenden mittleren Jahrestemperaturen, die Frosthärtung der Bäume im Herbst abnimmt und somit die Anfälligkeit gegenüber plötzlichen Kälteeinbrüchen zunimmt. Dies hätte wirtschaftliche Verluste zur Folge (Hänninen 1991). Andererseits ergaben Simulationen, dass die Fichten aufgrund der kürzeren Winterperioden nicht mehr Frostschäden erfahren als heutzutage (Hänninen et al. 2001). Koniferen bilden sehr schnell Rassen aus, was auf ihr hohes Potential, sich an die gegebenen klimatischen Bedingungen eines Standortes schnell anzupassen, zurückzuführen ist (Johnson und Skroppa 1997). Es ist relativ wenig über die molekularen Mechanismen der Anpassungsfähigkeit der Fichte bekannt (Johnson und Skroppa 1996). Dies liegt neben ihrer langen Generationszeit (30 Jahre Minimum) auch daran, dass die Kenntnisse über Struktur und Zusammensetzung des Fichtengenoms ( $1,5-3 \times 10^{10}$  Basenpaaren) gering sind. Es ist bekannt, dass etwa 75 % des Genoms aus repetitiver DNA in nichtkodierenden Bereichen besteht (Dhillon 1987). Das Pappelgenom dagegen hat eine Größe von ungefähr 520 bis 550 Megabasenpaaren (Tuskan et al. 2003). Es ist damit ähnlich groß wie das Reisgenom, 4 x größer als das Arabidopsisgenom und 40 bis 50 mal kleiner als das Genom der Kiefer (Wullschleger et al. 2002). Häufig wird versucht, Ergebnisse leichter zugänglicher Modellorganismen auf die Fichte übertragen.

### 1.3 Arabidopsis als Referenzpflanze

*Arabidopsis thaliana* (Ackerschmalwand) ist ein nützlicher und wichtiger Modellorganismus in der Pflanzenbiologie. Sie gehört zu der Familie der Kreuzblütler mit einer weiten Verbreitung in Europa, Asien und Nordamerika. Columbia und Landsberg sind die gebräuchlichsten Ökotypen in den meisten Studien (Meyerowitz 1987).

Aufgrund des kleinen und einfach strukturierten Genoms von 125 Megabasen, ist *Arabidopsis* wichtig für genetische und molekularbiologische Studien. Die Sequenzierung des Genoms wurde im Jahre 2000 abgeschlossen. Das Genom besteht aus 5 Chromosomenpaaren, von denen detaillierte Karten erstellt wurden (Sommerville und Korneef 2002). Tausende von Mutanten sind in den letzten Jahrzehnten identifiziert worden (Meyerowitz 1987). So konnten viele Mechanismen im pflanzlichen Stoffwechsel, der Reproduktion, dem Wachstum und der Entwicklung punktuell untersucht werden. Damit ist *Arabidopsis* ein wichtiger Organismus für die Grundlagenforschung (Meineke et al. 1998). Die vielen existierenden Mutanten beschleunigen den Forschungsprozess, der sonst mit Untersuchungen an Hefe oder Tieren begann und dann erst auf die Pflanzen übertragen wurde (Meineke et al. 1998). *Arabidopsis thaliana* weist große genetische Übereinstimmungen mit den wichtigsten, in den Industrieländern gebräuchlichen, Kulturpflanzen und allen anderen Bedecktsamern auf. Dies macht sie zu einer besseren Modellpflanze als Hefe für Einzeller oder *Drosophila* bzw. der Fadenwurm für Tiere (Sommerville and Meyerowitz 1994).

*Arabidopsis* hat einen kurzen Generationszyklus von ungefähr sechs bis acht Wochen und lässt sich auf relativ kleinem Raum kultivieren. Sie wächst auf Agar, in Erde unter natürlichem Licht im Gewächshaus oder Fluoreszenzlicht im Labor (Meineke et al. 1998). Eine Pflanze kann 10000 bis 30000 Samen produzieren, auch durch Selbstbefruchtung („Selbsten“). Es existiert ein umfangreiches Netzwerk von Datenbanken, Stammsammlungen, Internet- und Nachrichtengruppen, Genomzentren und Forschergruppen, welches Anregungen zum Forschen gibt und Hilfe bei Ergebnisanalysen (Sommerville und Koorneef 2002).

### 1.4 Genomisches Imprinting und maternale Effekte

Ausgangspunkt für die Beobachtung dieses Phänomens bei Fichten (*Picea abies*), war die Einrichtung von Vermehrungsanlagen beziehungsweise Samenplantagen im Süden Norwegens. Diese dienten dazu, Fichten aus den nördlichen Verbreitungsgebieten

schneller zu vermehren, um eine verbesserte Aufforstung zu erreichen. Dafür wurden Mutterpflanzen über weite Distanzen von Norden in den Süden und vom Hochland ins Flachland transportiert. Die Mutterpflanzen wurden im warmen Süden vermehrt. Dabei zeigte die daraus hervorgehende Tochtergeneration einen späteren Knospenansatz im Herbst und einen späteren Knospenaustrieb im Frühjahr als die „Geschwister“ aus dem Ursprungsgebiet der Mutter, die sich unter den dort gegebenen Bedingungen vermehrt hatten (Johnson 1989 b). Die Nachkommen aus der Kreuzung in den Samenplantagen zeigten damit eine Wachstumsphase, die den im Süden verbreiteten Provenienzen mehr ähnelte. Am deutlichsten zeigte sich dieser Unterschied in der höheren Frostempfindlichkeit der Nachkommen aus dem Süden gegenüber den Nachkommen im Norden, obwohl die Mutter aus einem nördlichen Verbreitungsgebiet stammte und damit gerechnet wurde, dass die Anpassung an Kälte sich vererbt (Johnson 1989, Anderson 1994). Dieses unterschiedliche Verhalten in der ersten Generation lies sich nicht ausschließlich mit dem Sameneffekt oder der subjektiven Auswahl der Mutterpflanzen erklären (Johnson 1989a, Johnson und Ostreg 1994).

Gezielte Kreuzungen von gleichen Elternpaaren im Gewächshaus unter warmen Temperaturen und parallel dazu im Freiland unter etwas kälteren Bedingungen im Frühjahr brachten den gleichen Effekt. Die Nachkommen der im Gewächshaus gekreuzten Fichten waren im Trend frostempfindlicher als die Nachkommen des gleichen Elternpaares, das draußen gekreuzt wurde (Johnson and Skroppa 1996). Das hat für das Auspflanzen solcher Nachkommen auf freien Flächen, insbesondere in nördlichen Gebieten, einen wichtigen Einfluss auf das Überleben der Bäume und deren generelle Fitness (Johnson 1989b,c, Hänninen 2001). Dies lies die Forscher vermuten, dass die Umwelt, die bei der sexuellen Reproduktion herrschte, einen wichtigen Einfluss auf den Phänotyp der Nachkommenschaft hat (Johnson und Skroppa 1996). Dabei kristallisierten sich bei den Fichten Licht und/oder Temperatur als entscheidende Umweltfaktoren heraus. Diese Faktoren haben vermutlich den größten Einfluss auf die Nachkommenschaft während der Zeit der Embryogenese bis zur Samenreife und können die Genexpression variieren (Johnson et al. 2005). Sie wirken zusätzlich zu den kerngebundenen genetischen Vorgaben der Eltern bei der Ausprägung des späteren Phänotyps. Der Begriff des genomischen Imprintings wurde für die Fichten übernommen (Johnson und Skroppa 2001).

Das genomische Imprinting spielt eine wichtige Rolle in der Fortpflanzung bei Tieren, indem es einen Einfluss auf die weitere Entwicklung des Embryos im Mutterleib und nach der Geburt hat. Viele Untersuchungen sind daher bei Mensch und Maus gemacht worden

(Reik und Walter 2001). Genomisches Imprinting gibt es auch bei Pflanzen (Messing und Grossnicklaus 1999). Es wird als sowohl bei Tieren als auch bei Pflanzen als Vorgang angesehen, der nicht der Mendelschen Vererbungslehre folgt, also epigenetisch ist. Dabei geht es um einen reversiblen Einfluss auf die Expression eines Gens innerhalb der Nachkommen, je nachdem von welchem Elternteil es vererbt wird (Matzke und Matzke 1993).

Bei Pflanzen ist es, im Vergleich zum Tier, etwas komplizierter, da hier durch doppelte Befruchtung im Prinzip zwei „Nachkommen“ (Embryo und Endosperm) hervorgehen. Dabei ist der Embryo diploid und die Zygote triploid (Messing und Grossnicklaus 1999). Aufgrund der bisherigen Forschungsergebnisse wird vermutet, dass das genomische Imprinting hauptsächlich im Endosperm stattfindet, das die Nährstoffe von der Mutterpflanze speichert bzw. an den Embryo weitertransportiert (Adams et al. 2000, Gehring 2004). Wenn also das Endosperm eine Veränderung erfährt, hat es somit Auswirkungen auf die Entwicklung des Embryos. So muss bei den Angiospermen innerhalb des Endosperms unter anderem das 2:1 Verhältnis von weiblichem zu männlichem Genom stimmen, damit keimungsfähige Samen entstehen (Matzke und Matzke 1993). Manipulationen durch Interploidi Kreuzungen stören die Balance der weiblichen und männlichen Chromosomensets zueinander und führen zum Teil zum Absterben des Embryos (Gehring et al. 2004). Bisher konnten einige wenige Gene identifiziert werden, die über genomisches Imprinting an die Nachkommen weitergegeben werden. Sie codieren Speicherproteine oder steuern Wachstum und Entwicklung (Allemann und Doctor 2000). Das genomische Imprinting scheint unter anderem auf der Modifizierung der DNA mittels Methylierung oder Veränderung der Chromatinstruktur zu beruhen (Matzke und Matzke 1993, Reik und Walter 2001). Das genomische Imprinting im engeren Sinne betrachtet den Methylierungsgrad der Gameten und die Auswirkung von genetischer Manipulation dieses Methylierungsgrades auf die Entwicklung des Endosperm (Adams et al. 2000). Der Einfluss der Umwelt auf die DNA-Methylierung wurde hier bisher außer Acht gelassen. Dabei wird DNA Methylierung in Zusammenhang mit der Anpassung an Umwelteinflüsse gebracht (Richards 1997).

Die Umwelt ändert sich häufig über Zeit und Raum. Die Umwelt, die die Nachkommen vorfinden, kann eine andere sein, als die der Eltern. Es reicht aus, dass die Samen durch Wind und Insekten weiter weg vom elterlichen Standort getragen werden oder sich Licht und Temperatur durch Beschattung ändern (Donohue und Schmitt 1998). Pflanzen interagieren mit ihrer Umwelt und müssen sich an wechselnde Bedingungen am Standort

adaptieren. Dies kann zu einer Art Mikroevolution führen, bei der bestimmte Genfrequenzen innerhalb der Population verändert werden und somit der Phänotyp verändert wird (Kalisz und Purugganan 2004). Ein anpassungsfähiges Merkmal ist ein Aspekt in dem Entwicklungsmuster eines Organismus, das die Wahrscheinlichkeit des Überlebens und Reproduktion eines Organismus unter den gegebenen Umweltbedingungen erhöht (Dobzhansky 1956). Diese neuen, an die Umwelt angepassten Merkmale können an die nächste Generation epigenetisch, also außerhalb des Genoms, weiter vererbt werden. DNA-Methylierung wird als weit verbreitete Grundlage dieser Art der Anpassung angesehen (Kalisz und Purugganan 2004). Ist ein bestimmter DNA-Abschnitt methyliert, wird er nicht mehr transkribiert. Unterschiede im Methylierungsgrad können zu Unterschieden in der Genexpression und damit zu Unterschieden im Phänotyp führen (Kalisz und Purugganan 2004). Diese Vorgänge scheinen einen Einfluss auf die Fitness der Nachkommen zu haben und bilden eine schnelle und reversible Alternative in der evolutionsgeschichtlichen Entwicklung eines Organismus (Richards 1997). Sie werden unter dem Begriff phänotypische Plastizität beschrieben. Allgemein sind es die evolutionären Einflüsse wie natürliche Selektion, genetischer Drift, Genfluss und Mutationen, die die Variabilität einer Population beeinflussen (Eriksson 1998). Da Adaptation über Selektion eine Veränderung des Genpools bedeuten kann, hat die Pflanze über Veränderungen der Methylierung der DNA die Möglichkeit, dies abzapuffern und so die genetische Vielfalt innerhalb der Population zu erhalten (Perez da la Vega 1996). Die phänotypische Plastizität spielt hauptsächlich eine Rolle, wenn sich die Umweltbedingungen langsam und in kleinem Umfang ändern. Unter harschen Umweltbedingungen herrscht die Auslese vor, die den Genpool verkleinert (Perez da la Vega 1996). In Skandinavien wurden bei Fichten einheitliche, phänotypische Unterschiede entlang der Breitengrade entsprechend den dort herrschenden klimatischen Bedingungen beobachtet. Dennoch herrschte eine hohe Variabilität in bezug auf Wachstumseinstellung und Frosthärtung im Herbst innerhalb der Familien an den jeweiligen Standorten (Skroppa und Johnson 1999).

Mazer und Gorchov (1996) konnten zeigen, dass die Umwelt eine Auswirkung auf die Eigenschaften des Pollens und damit auf die Eigenschaften der Nachkommen hatte. Es wird dann der Begriff des paternalen Effektes benutzt. In der Hauptsache wird den weiblichen Gameten und der Mutterpflanze eine bedeutendere Rolle bei der Weitergabe von Eigenschaften zugesprochen, da der Samen an der Mutterpflanze reift. So wird neben dem Begriff des parental Effektes oft die Bezeichnung des maternalen Effektes verwendet. Roach und Wulff (1987) definierten den maternalen Effekt als Beitrag des



mütterlichen Elternteils auf den Phänotyp der Nachkommen, zusätzlich zu der Vererbung über die Chromosomen, die von beiden Elternteilen zu gleichen Teilen stammen. Sie unterschieden dabei drei Kategorien: Erstens die Eigenschaften, die genetisch über das Cytoplasma weitergegeben werden, da Organellen wie die Plastiden und Mitochondrien nur mütterlich vererbt werden. Die zweite Kategorie beinhaltet alle Einflüsse über das Endosperm („endosperm nuclear“). Die dritte wurde als „maternal phänotypisch“ bezeichnet und umfasst z. B. die Samenhülle, die umweltbedingt unterschiedlich ausgeprägt sein kann. Lacey (1998) definierte den Begriff des parental Effektes als phänotypisches Produkt der Weitergabe von Informationen von den Eltern an die Nachkommen, die zusätzlich zum elterlichen kerngebundenen Anteil an der genetischen Ausstattung der Nachkommen stattfindet. Zudem definierte sie den Begriff des umweltbedingten parental Effektes als einen, der erstens durch einen Stimulus aus der Umwelt in der Elterngeneration induziert wurde und zweitens nicht ausschließlich auf den elterlichen Genotyp zurückgeführt werden kann.

Bisherige Untersuchungen konzentrierten sich unter anderem darauf, an welcher Stelle, von Gametenentwicklung über Befruchtung bis hin zur Samenreifung, die Umwelt den größten Einfluss auf die Eigenschaften der Nachkommen hat. Eine Theorie setzt bei der Entwicklung der Keimzellen an, bei denen unter bestimmten Umwelteinflüssen entweder mütterlicherseits in den Megasporen oder väterlicherseits in den sich entwickelnden Pollen bestimmte Allele durch Methylierung modifiziert werden und so über das genomische Imprinting die Entwicklung der Nachkommen beeinflussen (Lacey 1996, Owens et al. 2001, Johnson et al. 2005). Eine andere konzentriert sich auf den Einfluss der Umwelt während der Samenproduktion und –reifung (Lacey 1996). Johnson et al. (2005) und Rositter (1996) sprachen von einem „Gedächtnis“ (memory effect) durch die Umwelt, die auf die Elterngeneration während der Samenproduktion bzw. -reifung eingewirkt hat. Dieses Gedächtnis kann eine Generation oder mehrere überdauern und ist das Resultat von genetischer und epigenetischer Selektion.

Untersuchungen zu maternalen Effekten wurden in einigen krautigen Pflanzenspezies wie *Plantago lanceolata*, *Arabidopsis thaliana*, *Iris hexagona*, *Brassicca juncea*, *Viola tricolor*, *Pisum sativum*, *Desmodium paniculatum*, *Campanula americana* und *Echinochloa crus galli* durchgeführt. Dabei wurden die verschiedenen Einflüsse von Licht (Munir et al. 2001), Nährstoffvorkommen (Galloway 2001b), Temperatur (Potvin und Charest 1993, Lacey 1996, Andalo et al. 1999), Salzstress (van Zandt und Mopper 2004) oder die Pflanzdichte (Mazer und Wolfe 1998) auf den Phänotyp der Nachkommen untersucht. Bei

Experimenten, die den Einfluss der Temperatur auf die Nachkommen untersuchten, wurde unter anderem beobachtet, dass die Samen aus der warmen Kreuzungsumgebung kleiner waren, als die aus der kalten Kreuzungsumgebung (Gray et al. 1988, Lacey 1996). Froststressversuche ergaben zunächst keine Unterschiede zwischen den Nachkommen aus der warmen Kreuzungsumgebung und den Nachkommen aus der kalten Kreuzungsumgebung (Charest und Potvin 1993). Zudem zeigten sich Unterschiede im Wachstum und der Blühinduktion bei den Nachkommen aus den verschiedenen temperierten Kreuzungsumgebungen (Lacey 1996, Andalo et al. 1999). Bei mehrjährigen Pflanzen im Allgemeinen oder Bäumen im Speziellen liegen vergleichsweise wenige Erkenntnisse vor. Neben der Fichte wurden epigenetische Effekte bei anderen Nadelgehölzen wie Weißfichte (Bigras und Bonlieu 1997), Kiefer (Dormling und Johnson 1992) oder Lärche (Greenwood und Hutschinson 1996) untersucht.

Maternale Effekte bei krautigen Pflanzen werden häufig anhand der Samen untersucht, da diese Effekte dort am ausgeprägtesten sind (Wulff 1995). Es wird unter anderem die Dormanz und Keimfähigkeit des Samens beobachtet (Munir et al. 2001, Lacey 1996, Charest und Potvin 1993). Der Zeitpunkt, wann ein Samen reift, der Ort an der Mutterpflanze, wo er reift und die Umweltbedingungen, die zu dem Zeitpunkt der Reife herrschen scheinen alle einen Einfluss auf dessen Keimfähigkeit und Keimschnelligkeit zu haben (Gutterman 2000). Durch schnelle Keimung können neue Flächen schneller besiedelt werden, oder die Pflanze kann potentiellen Konkurrenten um Nährstoffe zuvorgekommen. Man spricht dann von einer erhöhten Fitness der Pflanzen (Lacey et al. 2003). Maternale Effekte können die Keimung beeinflussen und werden als adaptiv bewertet, wenn sie die Behauptung einer Population vor Ort verbessern (van Zandt und Mopper 2004). Häufig wurde das Gewicht der Samen bestimmt, seltener wurden Nährstoffanalysen durchgeführt (Johnson and Skroppa 1995, Charest und Potvin 1993, Galloway 2001a). In Zusammenhang mit dem Samengewicht und dem Anteil an Nährstoffen in der Samenhülle wirken die maternalen Effekte weiter auf die sich entwickelnde Pflanze. Oft gehen aus großen Samen Pflanzen hervor, die schneller wachsen und mehr Blattmasse produzieren (Lacey 1996, Andalo et al. 1998). Bei älteren Pflanzen wurden die maternale Effekte zum Teil durch Unterschiede in der Blühinduktion und im Samenertrag sichtbar (Andalo et al. 1999). Dennoch äußern sich maternale Effekte am stärksten bei der Keimung und bei den ersten Wachstumsstadien. Später wird der Einfluss des Genoms der Nachkommen stärker und die maternalen bzw. parental Effekte verschwinden oder treten in Kombination mit dem Genotypen der Nachkommen auf

(Roach und Wulff 1987). Sie können auch von der Umwelt, der die Nachkommen ausgesetzt sind, maskiert werden (Wulff et al. 1994, Lynn und Kittelson 2004).

Nachkommen aus verschiedenen Umwelten sind in ihrer Reaktion auf Trockenstress oder Froststress untersucht worden (Wulff 1986, Charest und Potvin 1993). Keimungserfolg, Wachstum und Toleranz gegenüber Stress variieren zwischen den Individuen einer Population (Van Zandt und Mopper 2004). Dennoch reagieren nicht alle Genotypen auf sich verändernde Umweltbedingungen (Wulff et al. 1994, Andalo et al. 1999). Mazer und Wolfe (1998) beobachteten bei wildem Rettich (*Raphanus sativus* L.) Chargen, die auf verschiedene Pflanzendichten mit der Produktion unterschiedlich großer Samen reagierten, und solche, die unabhängig von der Pflanzendichte immer Samen gleicher Größe produzierten.

## 1.5 Abiotischer Stress

Kälte, Frost und Trockenheit sind die häufigsten Ursachen für Ertragseinbußen in der Land- und Forstwirtschaft. Kälte und Frost können bei nicht angepassten Pflanzen und bei noch nicht abgehärteten Pflanzen zu Schäden in der Zelle führen.

Ein erster Angriffspunkt von Kälte ist die Zellmembran, die durch unangepasste Zusammensetzung der Membranlipide erstarren und so ihre Funktion verlieren (Hansen 2000). Die Reaktionsgeschwindigkeits-Temperatur-Regel (RGT-Regel) besagt, dass bei einer Temperaturerhöhung um 10 °C, sich die Geschwindigkeit einer biochemischen Reaktion verdoppelt. Somit verlaufen die biochemischen Prozesse bei abnehmender Temperatur langsamer ab. Die Stoffwechselprozesse sind unterschiedlich temperaturabhängig und können bei Kälte nicht mehr in einem ausgewogenen Verhältnis zueinander ablaufen (Hansen 2000). Dies kann zu einem verringerten Wachstum führen (Larcher 2001). Pflanzen können sich an tiefe Temperaturen adaptieren (Savitch et al. 2001) bzw. nach einsetzendem Temperaturanstieg wieder erholen.

Frost beeinträchtigt ebenfalls das Wachstum, verursacht Welken bzw. das Vertrocknen von Blättern, führt zu Chlorosen und im schlimmsten Fall zum Tod von Geweben oder ganzen Pflanzen (Guy 2003, Takas 2004). Wenn eine schnelle Abkühlung stattfindet, bilden sich Eiskristalle in den Zellen, die das Plasmalemma zerstören können (Rizza et al. 2001). Bei langsamer Abkühlung bilden sich die Eiskristalle in den Interzellularen. Diese Eiskristallbildung führt zu einem Wasserausstrom aus dem Protoplasten. Durch diese Dehydrierung konzentrieren sich Salzionen, die die Enzymfunktionen beeinträchtigen

können (Guy 2003, Hansen 2000). Trockenheit führt in Pflanzen ebenfalls zu eingeschränktem Wachstum, verringertem Saftfluss, Chlorosen und Veränderungen in der Zellstruktur (Rothe et al. 1999, Palomaki et al. 1994).

Viele Untersuchungen zeigten, dass sowohl Kälte als auch Trockenheit die Photosynthese beeinträchtigten (van Heerden und Krüger 2000, Yordanov et al. 2000). So wird zum Beispiel die Aktivität von Photosystem II (PS II) negativ beeinflusst (Gillies and Binder 1996, Yordanov et al. 2000). Die Aktivität von PS II kann als relative Quantenausbeute mittels Chlorophyllfluoreszenz gemessen werden (Maxwell and Johnson 2000). Die Chlorophyllfluoreszenz wird oft als physiologischer Parameter benutzt, um die Reaktion der Pflanzen auf Stress zu beobachten bzw. den Stress innerhalb der Pflanze zu quantifizieren (Lichtenthaler 1996). Sie wird sowohl an Pflanzen im Licht als auch an dunkeladaptierten Pflanzen gemessen. Die Ergebnisse im Licht sind ein Maß für die Quantenausbeute durch das PS II, die Ergebnisse aus dem Dunkeln geben die maximale photosynthetische Aktivität von PS II an (Maxwell and Johnson 2000, Rohacek 2002). Die Chlorophyllfluoreszenz nimmt sowohl unter Trockenstress als auch bei Kälte in Fichten und Arabidopsis ab (Eastman and Camm 1995, Savitch et al. 2001, Blödner et al. 2005).

Als weiterer Parameter zur Charakterisierung von Trockenstress wird das Wasserpotential verwendet, während die Schädigung durch Kälte und Frost mit Hilfe der Elektrolytleitfähigkeit festgestellt werden kann (Scholander et al. 1965, Neuner and Buchner 1999).

Trockenstress verursacht eine Reduktion der PS II Aktivität und damit ein Ungleichgewicht im Elektronen- und damit Energietransport. Die überschüssige Lichtenergie kann durch PS I auf Sauerstoff übertragen werden und führt zur Radikalbildung (Polle 1996, Baker und Rosenqvist 2004). Diese Sauerstoffradikale werden über das antioxidative System innerhalb der Zelle unschädlich gemacht. Die in diesem System agierenden Enzyme wie Superoxiddismutasen (SOD) werden durch Trockenstress in ihrer Aktivität beeinflusst. So wurde die Aktivität von SOD unter Trockenstress bei der Fichte reduziert (Schwanz and Polle 2001, Alonso et al. 2001), während bei anderen Pflanzen, z. B. Bohnen, die Aktivität erhöht wurde (Bernardi et al. 2001). Ein anderes wichtiges Enzym im antioxidativen System ist die Peroxidase (POD). Sie kommt überall im Pflanzenreich vor und spielt u.a. eine Rolle in der Entwicklung, Wundheilung, Pathogen- und der allgemeinen Stressabwehr. In Weizen und Fichte wird sie unter Trockenstress hochreguliert (Zang und Kirkham 1994, Schwanz et al. 1996).

Trockenstress führt zu Veränderungen in der Zusammensetzung von Proteinen. Dies konnte unter anderem für Fichte und Gerste durch Veränderungen am Bandenmuster nach einer eindimensionalen Elektrophorese beobachtet werden (Leinhos und Bergmann 1995, Blödner et al. 2005). Heute ist die Auftrennung von Proteinen mit Hilfe der zweidimensionalen Elektrophorese ein wichtiges Mittel geworden, die Stressantwort von Pflanzen auf Proteinebene genauer zu untersuchen (Thiellement et al. 2002). Bisher sind solche Proteomuntersuchungen an trockengestressten Wassermelonen (Kawasaki et al. 2000), Arabidopsis (Wolfe Bianchi et al. 2002), Reis (Salekdeh et al. 2002a,b) und der Zuckerrübe (Hajheidari et al. 2005) durchgeführt worden. Bei Bäumen wurde die Reaktion der Strandkiefer auf Trockenstress mittels zweidimensionaler Elektrophorese untersucht (Costa et al. 1999). Die Resultate all dieser Untersuchungen ergaben wenige Überschneidungen der identifizierten Proteine (Hajheidari et al. 2005). Dies lässt zum einen auf eine vielschichtige Reaktion der verschiedenen Arten auf Trockenheit schließen. Zum anderen gibt es noch methodische Probleme, weil zum Beispiel in geringer Konzentration vorkommende Proteine nicht immer identifiziert werden können. Zu den bisher nach zweidimensionaler Auftrennung identifizierten Proteinen, die durch Trockenstress beeinflusst waren, gehören unter anderem die Ribulose-1,5-bisphosphat Aktivase im Kohlenstoffwechsel (Salekdeh et al. 2002 b), die Superoxiddismutase, die für die antioxidative Stressantwort verantwortlich ist (Hajheidari et al. 2005) oder Caffeoyl-CoA 3-Methyltransferase, die eine Rolle bei der Lignifizierung spielt (Costa et al. 1998, Salekdeh et al. 2002a). Bei Arabidopsis wurden unter Trockenstress Lea-Proteine (late embryogenesis abundant proteins) gebildet (Wolfe Bianchi et al. 2002). Diese Proteine verhindern, dass Makromoleküle miteinander reagieren und halten die Zellstruktur aufrecht (Close 1996).

## **1.6 Ziel dieser Arbeit**

Diese Arbeit hatte zwei Hauptziele:

1. Der Einfluss der Kreuzungsumgebung auf die Stressantwort bei Fichte sollte mit Hilfe biochemischer und physiologischer Parameter untersucht werden. Das Pflanzenmaterial stammte aus Norwegen. Es gliederte sich in verschiedene sogenannte Vollgeschwisterpaare. Diese Herkünfte setzten sich aus Nachkommen zusammen, bei denen die gleichen Eltern gezielt im Gewächshaus (warm) und im Freien (kalt) gekreuzt worden waren. Die Nachkommen aus diesen verschiedenen Kreuzungsumgebungen wurden mit Frost und Trockenheit gestresst. Es wurde geprüft, ob (a) unterschiedlich frostresistente Geschwisterpaare auch Unterschiede in der Trockentoleranz zeigen, (b) ob sich unterschiedliche Kreuzungsumgebungen auf die Frost- und Trockentoleranz auswirken.
2. Der Modellorganismus *Arabidopsis* wurde verwendet, um Auswirkungen der Kreuzungstemperatur auf Wachstumsverhalten und Stresstoleranz der Nachkommen zu untersuchen. Die Kreuzungen wurden selbst durchgeführt. Die Samen wurden bezüglich ihrer Nährstoffzusammensetzung biochemisch charakterisiert. Das Wachstumsverhalten und die Reaktion der Nachkommen auf Kältestress wurden mit Hilfe physiologischer Parameter untersucht. Mögliche Unterschiede in der Genregulation wurden molekularbiologisch mittels Real time PCR überprüft.

## 2 Material

### 2.1 *Gemeine Fichte (Picea Abies L. [Karst.]): Kreuzung und Anzucht*

Fichtensaatgut und einjähriges Pflanzenmaterial für die physiologischen und biochemischen Untersuchungen wurden von dem Norwegian Forest Research Institut (NISK Skogforsk, Ås/Norwegen) zur Verfügung gestellt. Die Pflanzen bzw. Samen stammten aus Kreuzungen, die 1993 oder 1998 in Biri (Norwegen, 60°57'N, 10°33'E, 150 m ü.N.N.) unter verschiedenen Umweltbedingungen gemacht wurden. Dabei wurden gleiche Elternpaare gezielt gekreuzt. Dazu wurde bei den als Vater fungierenden Fichtenklonen die Pollenproduktion induziert, der Pollen geerntet und aufgereinigt. Bei den als Mutter fungierenden Fichtenklonen wurde die Blütenbildung induziert. Der Pollen wurde gezielt auf die Blüten gebracht. Die Kreuzung wurde mit den gleichen Eltern im Gewächshaus und im Freiland zum selben Zeitpunkt im Frühjahr (Mai) durchgeführt. Wesentlich waren dabei die Umgebungstemperaturen, die während der Kreuzung und Embryogenese herrschten. Die Kreuzungsumgebungen werden daher als warm (im Gewächshaus gekreuzt) oder kalt (im Freiland gekreuzt) bezeichnet. Die Umweltbedingungen während der Kreuzung und Embryogenese, die Kreuzungspartner und das Kreuzungsjahr können Tabelle 1 entnommen werden. Diejenigen Sämlinge, die die gleichen Eltern haben, aber unter unterschiedlichen Umweltbedingungen gekreuzt wurden (warm/kalt), werden hier als Vollgeschwisterpaare bezeichnet.

Mit einigen dieser Geschwisterpaare sind im Vorfeld dieser Arbeit Froststressversuche durchgeführt worden. Die Schädigung der Fichten wurde anhand der Nadelbräunung abgeschätzt (Johnsen 1989). Die Werte sind für die in dieser Arbeit untersuchten Geschwisterpaare in Tabelle 1 ebenfalls aufgeführt.

**Tabelle 1** Liste der in der vorgelegten Arbeit verwendeten Vollgeschwisterpaare von gleichen Eltern, die im Gewächshaus oder im Freiland gekreuzt wurden. Die Nadelbräunungsstufen nach Froststress wurden von Mitarbeitern des Norwegian Forest Research Institute (NISK Skogforsk, Ås/Norwegen) persönlich mitgeteilt. Die aufgelisteten Stressexperimente wurden im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt. Die aufgelisteten Samenchargennummern werden im folgenden Text verwendet.

Mütterliches X väterliches Elternteil	Kreuzungs-jahr	Samencharge Nr.	Kreuzungs- gebung	Nadelbräunungs- stufe nach Frost	untersuchte Stressart	Herkunft
1641 x 6575	1998	15869	Gewächshaus	8.6	Trockenheit	1
		15872	Freiland	7.3		1
2736 x 1957	1998	15887	Gewächshaus	5.8	Trockenheit	2
		15890	Freiland	5.3		2
2735 x F2014	1993	15046	Gewächshaus	5.5	Trockenheit	-
		15044	Freiland	3.8		-
2513 x 1962	1993	15019	Gewächshaus	keine Angaben	Frost	-
		15018	Freiland	keine Angaben		-
2596 x F2116	1993	15021	Gewächshaus	keine Angaben	Frost	-
		15020	Freiland	keine Angaben		-



Die Fichtensamen der Vollgeschwisterpaare 15046/15044, 15869/15872, 15887/15890 wurden auf Vermiculite (Korngröße 3-6 mm) ausgesät und keimten im Gewächshaus unter folgenden Bedingungen: Die Temperatur betrug 18-22 °C am Tag und 15-18 °C in der Nacht. Die Sämlinge erhielten 24 Stunden Licht ( $50-100 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$  PAR, Osram L 58 W/25, Osram, München) zusätzlich zum natürlichen Licht. Die Sämlinge wurden 4-6 Wochen nach Aussaat in Pikiererde (Fruhstorfer Erde Typ P, Industrie-Erdwerk Archut, Lauterbach/Wallenrod) in Pflanzpaletten vereinzelt und wuchsen weiter im Gewächshaus unter den oben genannten Bedingungen. Nach 3-4 Monaten wurden die Pflanzen in einzelne Töpfe (0.25 l) in Pflanzerde (Fruhstorfer Erde Typ N, Industrie-Erdwerk Archut, Lauterbach/Wallenrod), gemischt mit Quarzsand (2 l: 70 l), getopft und in Klimakammern weiterkultiviert. Die Bedingungen dabei waren 24 Stunden Licht (Osram HQL-R 400 W,  $200 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$  PAR), 60 % Luftfeuchtigkeit und 20 °C Lufttemperatur. Die Vollgeschwisterpaare 15887/15890 und 15872/15869 wurden im Jahr 2001 ausgesät und herangezogen, das Vollgeschwisterpaar 15044/15046 im Jahr 2002. Die Pflanzen der Vollgeschwister 15044/15046 wurden in einem Alter von 1 Jahr noch ein zweites Mal in größere Töpfe (1 l) mit dem gleichen Erdgemisch umgetopft und in Gewächshäusern weiterkultiviert. Die Lufttemperaturen schwankten zwischen 20 °C bis 23 °C am Tag und 18 bis 20 °C in der Nacht. Zusätzlich zum Tageslicht wurden die Fichten mit künstlichem Licht ( $250-300 \mu\text{E/m}^{-2} \text{s}^{-1}$  PAR, Osram HQL 400 W, Osram, München) bestrahlt. Einmal im Monat wurden die Pflanzen gedüngt (Alkrisal: Concine minerale composto, NPK+Mg+Microelemente: 20-5-10[2], Wilhelm Haug GmbH & Co. KG, Ammerbruch) und vorsorglich gegen Pilzbefall gespritzt (Celaflor Spezial-Pilzfrei, Scotts Celaflor, Ingelheim am Rhein).

Die Vollgeschwister 15018/15019 und 15020/15021 wurden als Jungpflanzen von Prof. Skroppa (Norwegian Forest Research Institute) im Frühjahr 2003 als einjährige Setzlinge geliefert und in 1 l Töpfe wie oben aufgeführt getopft. Die Pflanzen wuchsen im Gewächshaus unter den folgenden Bedingungen: Temperatur 20-23°C am Tag und 18 bis 20 °C in der Nacht. Während des Tages wurden die Pflanzen zusätzlich mit Licht bestrahlt ( $250-300 \mu\text{E/m}^{-2} \text{s}^{-1}$  PAR, Osram HQL 400 W, Osram, München). Die Pflanzen wurden ebenfalls wie oben beschrieben gedüngt und gegen Pilzbefall gespritzt.

## 2.2 *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Kreuzung und Anzucht

Für die Versuche mit *Arabidopsis thaliana* wurde der Ökotyp Columbia Col-0 N1093 (Arabidopsis Information Service (AIS)-Collection, Nottingham Arabidopsis Stock Centre (NASC), Nottingham/Großbritannien) verwendet.

Vor dem Auslegen wurden die Arabidopsissamen mit 1 ml 5%iger w/v  $\text{Ca}(\text{OCl})_2$  – Lösung, welche 0,02 % v/v Triton enthielt, versetzt, geschüttelt und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die so sterilisierten Samen wurden 3-mal mit je 1 ml dd  $\text{H}_2\text{O}$  gewaschen, auf ein steriles Filterpapier pipettiert und auf MS-Wurzelmedium (Murashige and Skoog 1962, siehe Tabelle 2) ausgelegt.

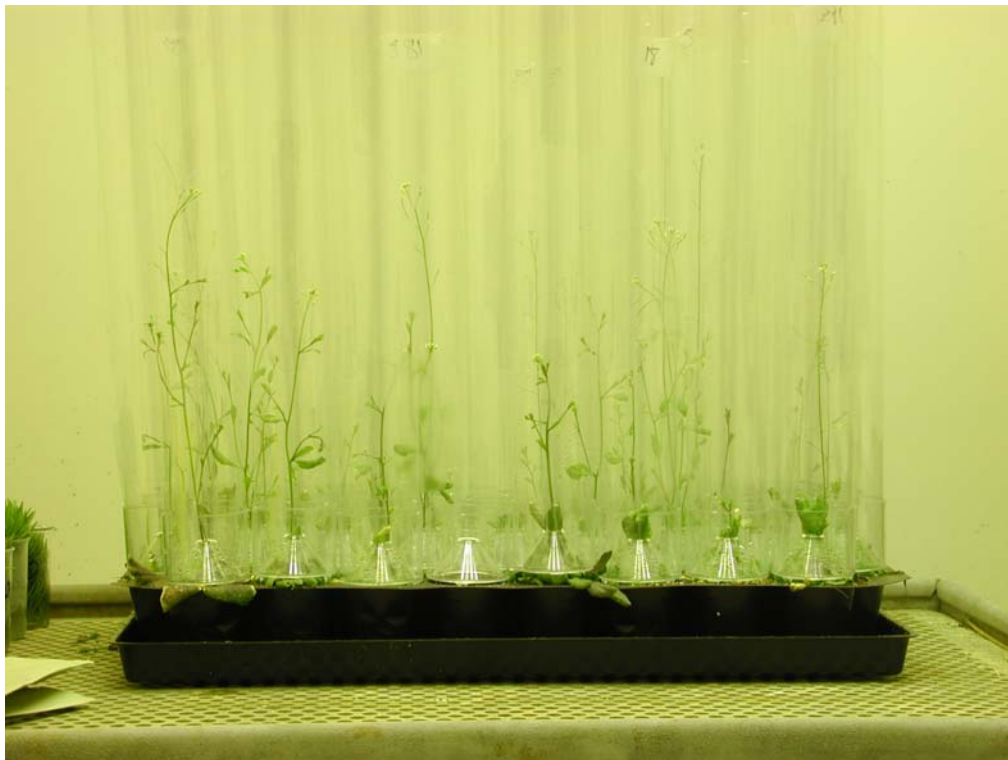
**Tabelle 2** Zusammensetzung des Wurzelmediums nach Murashige and Skoog. Die Konzentrationen der einzelnen Substanzen entsprechen den Ausgangskonzentrationen.

Makrosubstanzen		Vitamine	
$\text{KNO}_3$	247,0 mM	Nicotinsäure	4,061 mM
$(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4$	26,1 mM	Pyridoxin-HCl	2,4 mM
$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	16,2 mM	Thiamin-HCl	0,297 mM
$\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$	13,6 mM		
Mikrosubstanzen		Zusätzliche Stoffe	
$\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	5,9 mM	$\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{FeN}_2\text{NaO}_2$	5 ml/l
$\text{H}_3\text{BO}_3$	4,9 mM	Inosit	5 ml/l
$\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	1,0 mM	Glycin	1 ml/l
KJ	0,5 mM	Zucker	25 g/l
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	0,1 mM	Gelrite	2,8 g/l
$\text{CoCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$	0,1 mM		
$\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$	0,1 mM		

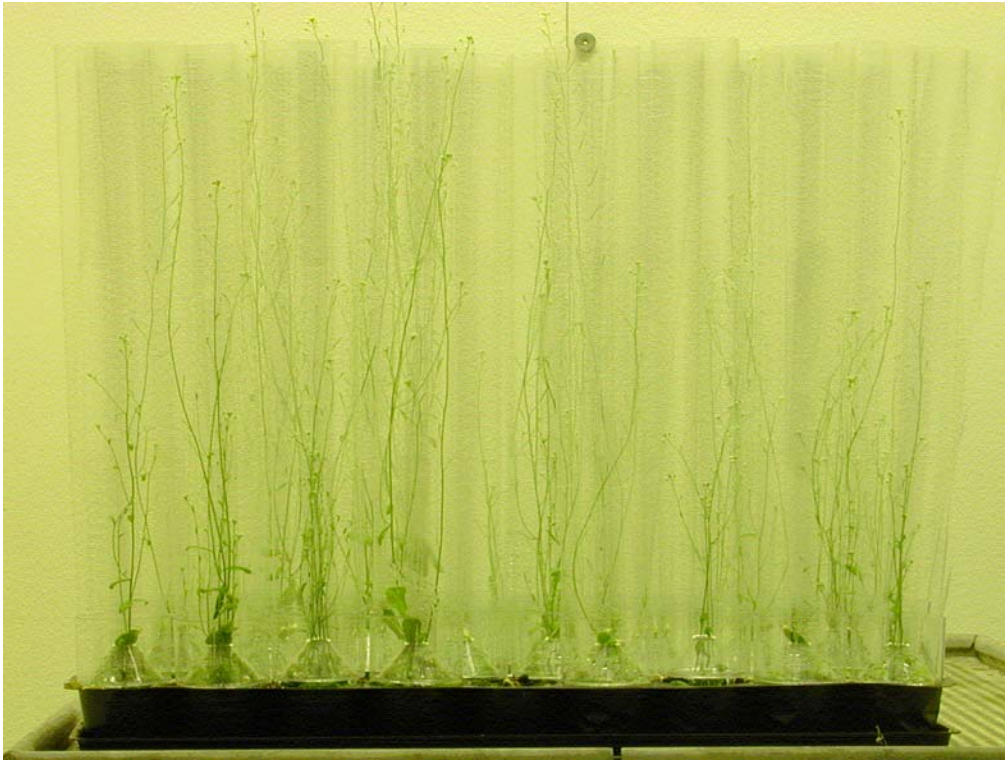
Für die Kreuzung im Jahr 2003 wurden die Keimlinge Anfang April unter Kurztagsbedingungen (8 h Licht,  $250 \pm 10 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$  PAR Osram HQL-R 400 W) in Klimakammern (Weistechnik, Gießen) bei 20 °C und 60 % Luftfeuchte angezogen. Die Pflanzen wurden nach zweieinhalb Wochen (Ende April) in eine Pflanzpalette pikiert (Fruhstorfer Erde Typ N, Industrie-Erdwerk Archut, Lauterbach/Wallenrod), auf 2 Klimakammern aufgeteilt (Weistechnik, Gießen) und für weitere drei Wochen unter Kurztag kultiviert, um eine größere Rosette zu erhalten. Ende Mai wurde in beiden Klimakammern auf Langtag (16 h Licht) umgestellt und gleichzeitig die Temperatur in der einen auf 15 °C erniedrigt und in der anderen auf 25 °C erhöht. Mit Ausbildung der Blüte wurde ein sogenanntes Arasystem (Ara System 360 KIT, BETATECH bvba, Gent, Belgien) über die Pflanze gestülpt, um eine Fremdbefruchtung zu vermeiden und um den

Samen einfacher ernten zu können. Die Samen reiften, nachdem die Bewässerung eingestellt wurde. Blüte und Samenreife verliefen unter den verschiedenen Temperaturen unterschiedlich schnell (Abbildungen 1 und 2). Samen der 25 °C warmen Kreuzungsumgebung wurden am 8.7.2003 geerntet, die aus 15 °C-Umgebung am 17.7.2003.

Eine zweite Kreuzung wurde 2004 in Klimakammern (Weistechnik Typ ZI800 Baujahr 1982) unter ähnlichen Bedingungen wiederholt. Dazu wurden die Samen nach dem Sterilisieren auf MS-Wurzelmedium ausgelegt und in der Klimakammer unter Kurztagsbedingungen: 20 °C, 8 h Licht ( $250 \pm 10 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$  PAR, Osram L140 W/20 SA) und  $50 \pm 5 \%$  Luftfeuchte angezogen. Die Pflanzen wurden am 01.03.2004 nach dreieinhalb Wochen wie oben beschrieben in Töpfe pikiert (je 28 Stück pro Ansatz), auf zwei baugleiche Klimakammern (Weistechnik Typ ZI800 Baujahr 1982) verteilt und unter Kurztag weiterkultiviert. Drei Wochen nach dem Pikieren wurde die Beleuchtung auf Langtag (16 h) umgestellt und die Temperaturen auf 25 °C erhöht bzw. auf 15 °C erniedrigt. Die Selbstbestäubung und Samenreifung erfolgte, wie im Vorrangegangenen beschrieben. Die Samen aus der warmen Kreuzungsumgebung wurden am 18.5.04 geerntet, die Samen aus der 15 °C kalten Kreuzungsumgebung am 11.6.2004.



**Abbildung 1** *Arabidopsis thaliana* in der Klimakammer mit einer Temperatur von 15 °C 1 Woche nach Blühinduktion im Jahr 2003.



**Abbildung 2** *Arabidopsis thaliana* in der Klimakammer mit einer Temperatur von 25 °C 1 Woche nach Blühinduktion im Jahr 2003.

## **3 Methoden**

### **3.1 Stressversuche**

#### **3.1.1 Trockenstress**

Die Trockenstressversuche wurden mit den Vollgeschwisterpaaren 15046/15044, 15869/15872, 15887/15890 in Klimakammern bei 20 °C, 60 % Luftfeuchtigkeit und 24 Stunden Licht durchgeführt. Das Dauerlicht imitierte Polartagbedingungen in Skandinavien während der Sommerzeit. Die hierfür verwendeten Sprösslinge waren 1 Jahr alt. Das erste Experiment wurde mit den Vollgeschwisterpaaren 15887/15890 und 15872/15869 durchgeführt und im folgenden als Trockenversuch I bezeichnet. Die Pflanzen waren im Durchschnitt 9-19 cm groß und wuchsen in Töpfen mit 0,25 l Erde. Der Versuch dauerte drei Wochen.

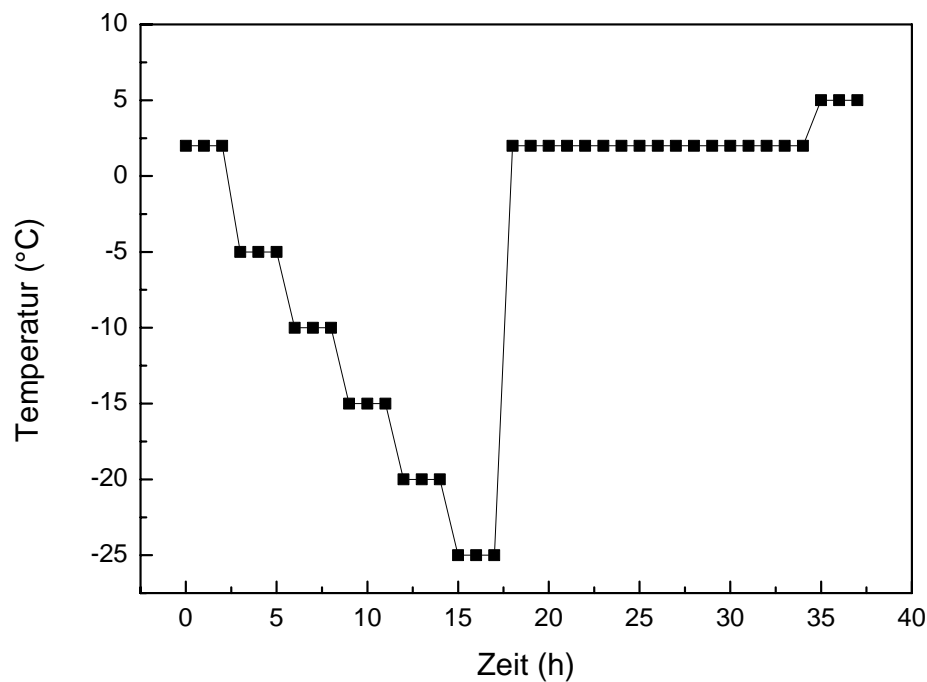
Bei einem weiteren Versuch wurden die Vollgeschwister 15046/15044 verwendet. Dieser wird im folgenden als Trockenversuch II bezeichnet. Hier waren die Pflanzen zwischen 20 bis 30 cm groß und befanden sich in 1 l Töpfen. Dieser Trockenstressversuch dauerte 6 Wochen. In beiden Fällen wurde der Stress durch Nichtgießen induziert. Stress und Kontrollpflanzen befanden sich in ein und derselben Kammer, nur durch eine Plexiglasscheibe getrennt (Abbildung 3).



**Abbildung 3** Versuchsaufbau für die Trockenstressversuche 1 und 2 mit *Picea abies* [Karst.]L. in den Klimakammern. Im Vordergrund befinden sich die Kontrollen, im Hintergrund hinter der Plexiglasscheibe die trockengestressten Pflanzen.

### 3.1.2 Froststressversuche

Die Vollgeschwister 15018/15019 und 15020/15021 wurden in den Froststressexperimenten untersucht. Die Pflanzen wuchsen wie unter 2.1 beschrieben im Gewächshaus. Mit dem Ende der Vegetationsperiode wurde das zusätzliche Licht ausgeschaltet und die Temperatur den äußeren Bedingungen angepasst (10 °C), um eine Frosthärtung zu induzieren. Für den Froststress wurden die Pflanzen in Plastikwannen verstaut und die Töpfe mit Stroh und Vermiculite isoliert, um die Wurzeln zu schützen. Die Froststressversuche wurden im Oktober 2003 und Februar 2004 in einer hierfür konstruierten Klimakammer (HN1-1661-73, Karl Weiss, Gießen) durchgeführt. Es wurde ein Frostprogramm eingestellt, um die folgenden Bedingungen zu erhalten: Start bei 2 °C, 2h Temperatur gehalten, dann Temperatursenkung innerhalb von 10 min um 1 °C bis die nächste Temperaturstufe von -5°C erreicht wurde. Diese Temperatur wurde wieder 2 h gehalten, bis die Temperatur erneut gesenkt wurde. So wurden einzelne Temperaturstufen von -5°C, -10°C, -15 °C, -20 °C und -25 °C erreicht. Nach zwei Stunden bei -25 °C wurde die Temperatur wieder auf 2°C erhöht und für 24 Stunden gehalten (siehe Abbildung 4). Während des Froststresses befanden sich die Pflanzen im Dunkeln. Dies war nötig, weil die Klimakammer unter Licht die tiefen Temperaturen nicht erreicht hätte.



**Abbildung 4** Programmierter Temperaturverlauf während des Froststresses an Fichte in der hierfür konstruierten Klimakammer.

Der erste Frostversuch wurde im Oktober 2003 mit den Vollgeschwistern 15018/15019 durchgeführt. 30 Pflanzen wurden aus dem Gewächshaus in die Klimakammern gebracht. Am Ende jeder Temperaturstufe wurden je drei Pflanzen aus der Klimakammer zurück in das Gewächshaus gestellt. Die Pflanzen, die einer Temperatur von  $-25^{\circ}\text{C}$  ausgesetzt waren, blieben in der Kammer, bis die Temperatur von  $2^{\circ}\text{C}$  wieder erreicht war und wurden anschließend ebenfalls in das Gewächshaus gestellt.

Da nicht ausgeschlossen werden konnte, dass die Pflanzen, wenn sie aus einer tiefen Kammertemperatur unmittelbar zurück ins Gewächshaus kamen, zusätzlich einen Hitzeschock erlitten hatten, wurde der Froststressversuch mit Anwendungen im Februar 2004 wiederholt. Diesmal wurden zwei Vollgeschwisterpaare (15018/15019 und 15020/15021) für den Versuch verwendet. Die Wurzeln wurden zum Schutz mit Stroh und Vermiculite abgedeckt und die Pflanzen dem gleichen Frostprogramm ausgesetzt wie zuvor. Die Pflanzen blieben während des gesamten Froststresses in der Klimakammer. Anschließend blieben sie noch 17 h bei  $2^{\circ}\text{C}$ , bevor sie in das Gewächshaus ( $10^{\circ}\text{C}$ ) zurückgebracht wurden.

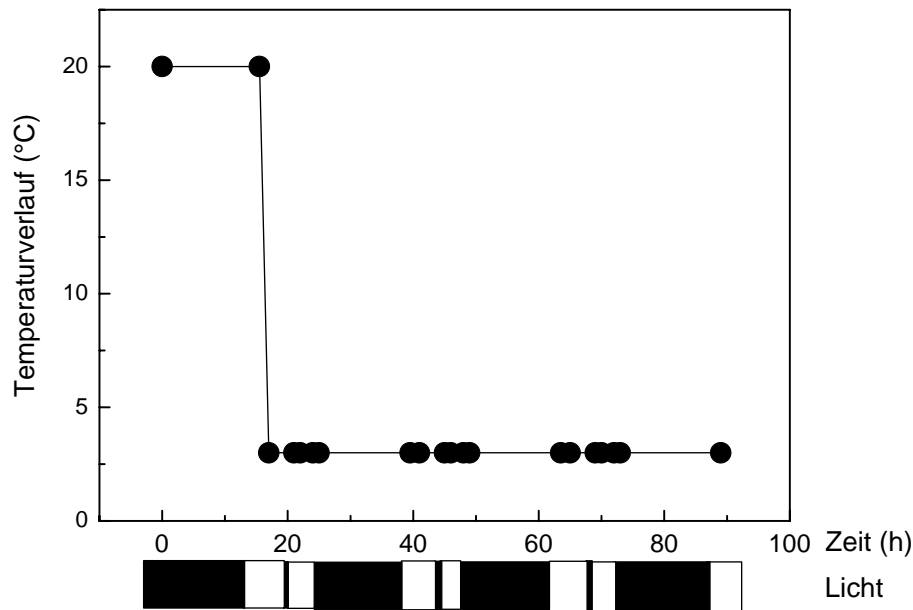
### **3.1.3 Kältestressversuch**

Arabidopsissamen aus den verschiedenen Kreuzungsumgebungen wurden auf Wurzelmedium (Murashige and Skoog 1962) ausgelegt und im Klimaschrank (Model AR 75-L CLF Plant Climatics, Emersacker) bei 20 °C, 8 Stunden Licht (100-150  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , F32T8/TL741, Universal/HLVision, Philipps, USA) und  $60 \pm 10$  % Luftfeuchtigkeit herangezogen. Nach zwei bis drei Wochen wurden sie auf Erde (Fruhstorfer Erde Typ T 25, Industrie-Erdwerk Archut, Lauterbach/Wallenrod) in Töpfe pikiert und unter den obengenannten Bedingungen drei Wochen weiterkultiviert, um genügend Pflanzenmaterial zu erhalten.

Vor dem Kältestressversuch wurden die Nachkommen beider Kreuzungsumgebungen in zwei Klimaschränke gleichen Typs (Model AR-75 L-LT, CLF Plant Climatics, Emersacker) verteilt und unter den oben genannten Bedingungen gehalten. Der Kältestress wurde durch Umstellen von einem Kurztagsprogramm (20 °C) auf ein Kälteprogramm (3 °C) induziert. Während des Kältestresses wurde eine konstante Temperatur von 3 °C gehalten (Abbildung 5). Es wechselten lediglich die Lichtbedingungen, die in einem 4-Schrittprogramm programmiert und gespeichert wurden. Die Tag/Nachtlänge betrug 8h/16h. Das Licht ging um 7.00 Uhr an. Nach 4 h Licht wurde um 11.00 Uhr eine 30-minütige Dunkelperiode eingebaut, anschließend brannte das Licht bis 15.00 Uhr (Abbildung 4).

Der Versuch ging über vier Tage und wurde dreimal wiederholt. Hierfür wurden sowohl Nachkommen aus dem Samen des Kreuzungsjahres 2003 als auch aus dem Samen des Jahres 2004 verwendet.





**Abbildung 5** Temperaturverlauf im Klimaschrank während des Kältestressversuchs mit *Arabidopsis thaliana*. Jeder Kreis markiert einen Messpunkt für die Chlorophyllfluoreszenz. Die Balken unter der Graphik kennzeichnen die Licht - (weiß) und Dunkelperioden (schwarz).

## 3.2 Ökophysiologische Parameter

### 3.2.1 Chlorophyllfluoreszenz

Chlorophyllfluoreszenz wurde mit Hilfe des MINI-PAM Gerätes der Firma Walz (Effeltrich, Deutschland) gemessen. Dieses Gerät gehört zu den modulierenden Messsystemen, was eine detaillierte Analyse der photosynthetischen Leistung des Photosystems II (PS II) am gesamten Blatt, aber auch in Algen und Chloroplasten ermöglicht. Hierbei wird ein kurzer, starker Lichtimpuls ( $3 \mu\text{s}$  mit einer wiederholenden Frequenz von 600 oder 20000 Herz) über eine Diode auf das Blatt appliziert. Bevor das Licht auf das Blatt trifft, wird es über einen Filter modifiziert, der Licht mit einer Wellenlänge von  $\lambda < 670 \text{ nm}$  durchlässt. Der Lichtimpuls erzeugt im Blatt die Emission von Chlorophyllfluoreszenzlicht. Das emittierte Signal wird durch zwei Filter, die Licht von einer Wellenlänge von  $\lambda > 700 \text{ nm}$  und keine Wärmestrahlung durchlassen, herausgefiltert, verstärkt und über einen Detektor gemessen (Betriebsanleitung Walz).

Die wichtigsten, gemessenen Parameter hierbei waren die maximale Fluoreszenz ( $F_m$ ), die Grundfluoreszenz ( $F_0$ ) und die aus der Differenz resultierte variable Fluoreszenz ( $F_v = F_m - F_0$ ). Dabei wird unterschieden, ob die Messung der Chlorophyllfluoreszenz im Licht oder

im Dunkeln erfolgte. Im Dunkeln sind alle Reaktionszentren offen. Ein sättigender Lichtimpuls führt zum sofortigen Schließen dieser und zur maximalen Chlorophyllfluoreszenzmission, die durch den zeitlich versetzt erfolgten Weitertransport der Energie über die Elektronentransportkette bald wieder gelöscht wird. Mit den Fluoreszenzwerten kann die maximale photosynthetische Aktivität, auch als maximale Quantenausbeute vom Photosystem II oder kurz als „Yield“ bezeichnet, berechnet werden.

**Gleichung 1**  $\text{Yield} = (F_m - F_0) / F_m = F_v / F_m$  (Kitajima and Butler 1975, Rohacek 2002)

Im Licht sind die Fluoreszenzwerte geringer und werden entsprechend mit  $F_{m'}$  und  $F_t$  (Steady State Fluoreszenz) bezeichnet. Die sich daraus ergebene aktuelle Quantenausbeute wird mit  $\Phi_{II}$  bezeichnet und analog zu Gleichung 1 berechnet:

**Gleichung 2**  $\Phi_{II} = (F_{m'} - F_t) / F_{m'}$  (Maxwell und Johnson 2000).

Während der Trockenstressversuche wurde die Chlorophyllfluoreszenz alle drei bis vier Tage sowohl im Dunkeln als auch im Hellen an 5 bis 6 Pflanzen gemessen. Für eine Dunkeladaptation wurden Ledersäcke über die Fichten gestülpt und nach 30 Minuten die Fluoreszenz gemessen.

Während des Froststresses wurde die Chlorophyllfluoreszenz an dunkeladaptierten Fichten sowohl in der Klimakammer als auch bei den Kontrollen im Gewächshaus gemessen. Für die Dunkelmessung im Gewächshaus während des Tages wurden ebenfalls Ledersäcke verwendet. Bei Fichten, die nach dem Froststress zur weiteren Beobachtung im Gewächshaus standen, wurde die Chlorophyllfluoreszenz vor Tagesanbruch gemessen.

Während des Kältestressversuchs mit *Arabidopsis thaliana* wurde die Chlorophyllfluoreszenz im Licht und im Dunkeln bei gestressten Pflanzen und Kontrollen in beiden Klimaschränken gemessen. Für die Dunkeladaptation wurde das Licht in der Klimakammer ausgeschaltet bzw. eine Dunkelperiode programmiert und die Chlorophyllfluoreszenz nach 30 min gemessen (siehe Abbildung 5).

### 3.2.2 Wasserpotential

Das Wasserpotential wurde während des Trockenstresses bei Fichten mit Hilfe der sogenannten „Scholanderbombe“ (Soil Moisture, Santa Barbara, CA) gemessen (Scholander et al. 1965). Dazu wurden Fichtenstämmchen oder Zweige mit einer scharfen Rasierklinge gerade abgeschnitten und in Alufolie gepackt, um Wasserverluste durch Transpiration zu vermeiden. Die Stämmchen wurden mit der Schnittfläche nach oben in einen druckfesten Stahlzylinder gesteckt und dieser luftdicht verschlossen. Über ein Ventil wurde langsam Luft aus einer Pressflasche (Atemluft DIN EN 12021, Messer Griesheim GmbH, Frankfurt) eingeleitet und so der Druck im Stahlzylinder erhöht. Über eine Lupe wurde die Schnittfläche beobachtet. Sobald der Xylemsaft an die Oberfläche trat, wurde das Ventil geschlossen, der Wert für das Wasserpotential in bar abgelesen und in MPa (1 bar = 0,1 MPa) umgerechnet. Bei beiden Trockenstressversuchen wurden drei Stämmchen bzw. Zweige zu jedem Erntezeitpunkt gemessen.

### 3.2.3 Bestimmung der Elektrolytleitfähigkeit

Die Elektrolytleitfähigkeitsmessung wurde an frostgestressten Fichtennadeln durchgeführt. Die Bestimmung der Elektrolytleitfähigkeit erfolgte nach Polle et al. (2001). Dazu wurden frische Nadeln von Zweigen entfernt und in der Mitte einmal geteilt. 150 mg Nadeln wurden eingewogen und in ein Falcon-Reaktionsgefäß mit 30 ml dd H<sub>2</sub>O gegeben. Die Leitfähigkeit in der Flüssigkeit (Blank) wurde sofort mit einem Konduktometer (Model LF 315/SET, WTW, Wissenschaftliche Technik, Weilheim) gemessen. Die Messung der Leitfähigkeit wurde nach 24 h (L1) und nach dem Autoklavieren (20 min bei 121 °C) wiederholt (L2). Alle Messungen fanden bei Raumtemperatur statt. Die Elektrolytleitfähigkeit (EL) wurde nach der folgenden Gleichung berechnet:

$$\text{Gleichung 3 } EL (\%) = [(L1 - \text{Blank}) * (L2 - \text{Blank})^{-1}] * 100$$

### 3.2.4 Ernte und Trockenmassebestimmung

Beim Trockenstressversuch I erfolgte die Ernte von je drei Kontrollpflanzen und gestressten Pflanzen nach 0, 14 und 21 Tagen. Beim Trockenstressversuch II wurden je sechs Kontroll- und gestresste Pflanzen nach 14, 31 und 43 Tagen geerntet. Die unterschiedlichen Zeitpunkte ergaben sich durch die verschiedenen Pflanzen- und

Topfgrößen (0,25l zu 2 l), die den zeitlichen Verlauf der Entwicklung des Trockenstressses beeinflussten.

Das Gesamtfrischgewicht von Nadeln, Zweigen und Wurzeln wurde bestimmt und Aliquots von Nadeln und Wurzeln zur weiteren Analyse bei  $-80\text{ °C}$  eingefroren.

Zur Trockengewichtsbestimmung bei Nadeln wurden etwa 200 bis 300 mg und bei Wurzeln ca. 500 mg Frischmasse in Rollrand-Schnappdeckelgläschen eingewogen. Die gesamten Stämmchen und Zweige wurden in Papiertüten zum Trockenen verpackt. Das Material wurde 72 h bei  $60\text{ °C}$  im Trockenschrank (Heraeus Instruments, Hanau) getrocknet und anschließend ausgewogen. Die Gesamttrockenmasse von Nadeln, Stamm und Wurzeln wurde berechnet. Der relative Wassergehalt wurde nach der folgenden Formel berechnet:

**Gleichung 4** Rel. Wassergehalt [%] =  $100 - ((TM[g]/FM[g])*100)$

Beim Froststress mit den Fichten wurden 3-5 Pflanzen pro Vollgeschwisterfamilie vor Beginn des Stressses, bei  $-20\text{ °C}$ , nach 17 h bei  $2\text{ °C}$  und nach 4 bis 8 Tagen geerntet. Hierbei wurden die Nadeln von Zweigen und Stamm getrennt und das Gesamtfrischgewicht bestimmt. Ein Teil der Nadeln (200-300 mg) wurde zur Trockengewichtsbestimmung in Rollrand-Schnappdeckelgläschen eingewogen und der Rest bei  $-80\text{ °C}$  gelagert. Die Zweige und Stämme wurden in Papiertüten verpackt und zusammen mit den Nadeln bei  $60\text{ °C}$  für 72 h getrocknet (Heraeus Instruments, Hanau).

Die Arabidopsispflanzen wurden am Ende eines jeden Kältstressversuches geerntet. Dabei wurden pro Kreuzungsumgebung, Stress und Kontrolle 7 Rosetten geerntet und bei  $-80\text{ °C}$  eingefroren. Bei weiteren 7 Rosetten pro Kreuzungsumgebung, Stress und Kontrolle wurde die Frischmasse bestimmt und die Blätter anschließend bei  $60\text{ °C}$  für 72 h getrocknet (Memmert, Schwabach).

### 3.2.5 Bestimmung des Samengewichts

Zur Gewichtsbestimmung der einzelnen Samen wurden je 100 Samen pro Kreuzungsumgebung ausgezählt und anschließend auf einer Feinwaage (Satorius, Göttingen) gewogen. Dieser Vorgang wurde für jede Kreuzungsumgebung und jedes Kreuzungsjahr 4 mal wiederholt.

### **3.2.6 Blattzuwachs**

Die Arabidopsispflanzen wurden aus Samen beider Kreuzungsumgebungen wie unter 3.1.3 beschrieben angezogen. Die Keimung auf dem Wurzelmedium wurde beobachtet und die Blätter gezählt. Nach dem Umtopfen auf Erde wurde im Vorfeld der Kältstressversuche in regelmäßigen Abständen von 3-4 Tagen die Blattanzahl der Rosetten ausgezählt.

### **3.2.7 Wurzelwachstum**

Wurzelwachstumsmedium (Murashige and Skoog 1962, siehe Tabelle 2) wurde in viereckige Petrischalen (Greiner Bio-One, Solingen) zu einer Höhe von 0,5 cm gegossen. Die Samen wurden wie zuvor sterilisiert und Reihen à zehn Samen pro Schale ausgelegt. Es wurden pro Kreuzungsjahr (2003/2004) fünf Schalen belegt, die je fünf Samen aus den zwei verschiedenen Kreuzungsumgebungen enthielten.

Diese Ansätze wurden in eine Plastikhalterung gestellt. Die Samen keimten in Klimaschränken (Model AR 75-L und Model AR-75 L-LT, CLF Plant Climatics, Emersacker, Deutschland) bei 8 h Licht ( $100-150 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , F32T8/TL741, Universal/HLVision, Philipps, USA) und  $60 \% \pm 10$  Luftfeuchtigkeit unter verschiedenen Temperaturen ( $10^\circ\text{C}$ ,  $15^\circ\text{C}$ ,  $20^\circ\text{C}$ ,  $25^\circ\text{C}$ ,  $30^\circ\text{C}$ ). Es wurde alle ein bis zwei Tage die Position der Wurzelspitze markiert. Wenn diese die untere Kante der Petrischale erreicht hatte, wurden die einzelnen Punkte ausgemessen und das Wurzelwachstum über die Versuchsdauer durch Aufsummieren berechnet.

## **3.3 Biochemische Analysen**

### **3.3.1 Herstellung von Rohextrakten und Gelfiltration**

Am Vortag der Extraktion wurden 400 mg PVPP-Pulver in Zentrifugenröhrchen eingewogen, mit 7 ml Extraktionspuffer ( $0,1 \text{ M KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ , pH 7,8, 1,5 % Triton X-100) versetzt und über Nacht bei  $4^\circ\text{C}$  vorgequollen. Die Nadeln wurden mit flüssigem Stickstoff in einem Mörser mit Pistel pulverisiert, 200 mg Nadelpulver wurden in das Extraktionsmedium eingewogen und gründlich gemischt (Reax 2000, Heidolph). Das Gemisch wurde 30 min bei  $4^\circ\text{C}$  und  $48.400 \text{ g}$  zentrifugiert (Beckman J2-HS, Beckman Coulter GmbH, Krefeld).

Der daraus resultierende Überstand wurde als Rohextrakt bezeichnet. Dieser wurde für Proteinbestimmung und enzymatische Messungen gelfiltriert. Hierbei wurden 2,5 ml

Rohextrakt auf Sephadexsäulen G-25 M (PD-10, Amersham Bioscience, Freiburg) gegeben und mit 3,5 ml Elutionspuffer (0.1 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ , pH 7,0) von diesen eluiert. Die Eluate wurden bei  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  gelagert.

### 3.3.2 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgte in den gelfiltrierten Extrakten mittels Bicinchoninic Assay Reagenz (BCA-Test, Uptima, Montelucon, Frankreich). Je 30  $\mu\text{l}$  einer Probe wurde mit 600  $\mu\text{l}$  Nachweisreagenzgemisch, das nach Herstellerangaben vorbereitet wurde, versetzt, gemischt und 30 min bei  $60\text{ }^\circ\text{C}$  inkubiert. Nach einer schnellen Abkühlung bei Raumtemperatur mittels Eis erfolgte die Bestimmung des Proteingehaltes photometrisch (Beckman DU 640, Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland) bei einer Extinktion von  $\lambda = 652\text{ nm}$ . Je Probe wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Eine Verdünnungsreihe von Rinderserumalbumin (Uptima, Montelucon, Frankreich) diene als Standard. Die Berechnung erfolgt über den Anstieg dieser Gerade mit Berücksichtigung der Verdünnung der Extrakte.

### 3.3.3 Bestimmung von Enzymaktivitäten

Die Bestimmung von Enzymaktivitäten wurde mit gelfiltrierten Extrakten durchgeführt. Es wurden die Aktivitäten von Guajakolperoxidasen (POD) (EC 1.11.1.7) und von Superoxiddismutasen (SOD) (EC 1.15.1.1) bestimmt.

Als Guajakolperoxidasen (GuPOD) werden alle Enzyme bezeichnet, die Guajakol als Kosubstrat zur Umsetzung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  verwenden können. Die Peroxidasebestimmung erfolgte nach der Methode von Püttner (1970), die von Polle et al. (1990) modifiziert wurde. Die Aktivität wurde über die Extinktionszunahme bei  $\lambda = 436\text{ nm}$  und  $25\text{ }^\circ\text{C}$  photometrisch (Ultraspec 4000, Amersham Pharmacia Biotech, Cambridge, England) bestimmt.

Jeder Testansatz enthielt:

500 $\mu\text{l}$	Kaliumphosphatpuffer (KPP), 100 mM, pH 5,25
50 –X $\mu\text{l}$	Elutionspuffer
X $\mu\text{l}$	Extrakt
400 $\mu\text{l}$	Guajakol, 100 mM

50  $\mu$ l            H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 200 mM

Durch Anpassung einer Regressionsgeraden an die Messpunkte, die vom Photometer über 4 min aufgenommen wurden, wurde die Extinktionsänderung bestimmt ( $\Delta E$ ). Die Berechnung der Aktivität in erfolgte nach dem Lambert-Beerschen Gesetz.

**Gleichung 5**  $\Delta E = \varepsilon \times \Delta c \times d$

$\Delta E$     = Extinktionsänderung

$\varepsilon$        = molarer Extinktionskoeffizient (für Guajakolperoxidase = 25,5 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>)

$\Delta c$      = Konzentration (mol/l)

$d$         = Küvettendicke

Der berechnete Wert  $\Delta c$  für die Aktivität von Guajakolperoxidase wurde mit den Verdünnungsfaktoren aus Elution, Küvette und Testansatz multipliziert, mit dem angesetzten Extraktionsvolumen verrechnet und mit dem eingewogenen Nadelpulver auf g FM bezogen. Es erfolgte die Umrechnung von mmol/g FM min in  $\mu$ M/g FM s, was wiederum in nkat/g FM umgewandelt wurde.

Die Aktivität der Superoxiddismutase wurde mit Hilfe des sogenannten Cytochrom C-Test gemessen. Dieser beruht darauf, dass die Cytochrom C-Reduktion, die durch Sauerstoffradikale via Xanthin-Xanthinoxidase vermittelt wird, durch im Extrakt vorhandene SOD gehemmt wird (McCord und Fridovich, 1969). Die Messung erfolgte photometrisch (Ultraspec 4000, Amersham Pharmacia Biotech, Cambridge, England) bei  $\lambda = 550$  nm und 25 °C.

Jeder Testansatz enthielt:

650  $\mu$ l            0,05 M KPP pH 7,8 (0,1 mM EDTA, 0,02 mM NaN<sub>3</sub>)

150-X  $\mu$ l        Elutionspuffer

X  $\mu$ l             Extrakt

100  $\mu$ l          Xanthin

50  $\mu$ l            Cytochrom C

50  $\mu$ l            Xanthin-oxidase (100 Units Ausgangskonzentration)

Zur Kalkulation der Superoxiddismutaseaktivität wurden die Absorbtiionsänderungen pro Minute für Ansätze mit Extrakt bzw. drei Kontrollen ermittelt und in die Gleichung nach Asada et al. (1974) eingesetzt:

**Gleichung 6**  $\text{Units} = V/v-1$

V = Absorbtiionsänderung pro Minute für Kontrollen

v = Absorbtiionsänderung pro Minute für Testansatz

Die Unit Aktivität ist demnach die Menge Superoxiddismutase, die im Testansatz die Reduktion des Cytochrom C im 50 % hemmt. Die Linearität dieser Hemmreaktion ist in Nadelextrakten bis zu einer Aktivität von 2 Units/Testansatz gezeigt worden (Polle et al. 1989). Die spezifische SOD Aktivität kann mit der nachfolgenden Gleichung berechnet werden.

**Gleichung 7**  $\text{SOD-Aktivität (Units/g FG)} = \text{Units} / \text{Testansatz} \times V_E \times V_R \times E / \text{FM}$

$V_E$  = eingesetztes Extraktvolumen (ml)

$V_R$  = Gesamtvolumen des Rohextrakt (ml)

E = Verdünnung durch Elution

FM = Frischmasse (g)

### 3.3.4 Eindimensionale Elektrophorese

Für die eindimensionale Elektrophorese wurde ein Rohextrakt wie unter 3.3.1 beschrieben hergestellt. Es wurde 1,5 g gemörsertes Nadelpulver, das von einer Mischprobe aus drei individuellen Nadelproben stammte, auf 3,0 g gequollenes PVPP in 30 ml Extraktionspuffer gegeben. Nach der Zentrifugation wurden die Proteine mit Hilfe von Ammoniumsulfat in zwei Schritten ausgefällt (England und Seifert 1990). Im ersten Schritt wurde Ammoniumsulfat langsam unter ständigem Rühren auf Eis bis zu einer Konzentration von 35 % w/v zum Rohextrakt dazugegeben. Das Gemisch wurde weitere 30 min auf Eis gerührt und anschließend 30 min bei 48.400 g und 4 °C zentrifugiert (Beckman J2-HS, Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland). Danach ließ sich das Chlorophyll als Häutchen vom Überstand mit Filterpapier entfernen. Im zweiten Schritt



wurde die Ammoniumsulfatkonzentration im Extrakt wie zuvor beschrieben auf 85 % w/v erhöht, 30 min auf Eis gerührt und zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in KPP Puffer gelöst (0,02 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{PO}_4$ , pH 7,8) und über Sephadexsäulen G-25 M (PD-10, Amersham Bioscience, Freiburg, Deutschland) eluiert.

Die Proteinkonzentration wurde mit Hilfe des BCA-Testes ermittelt und entsprechend verdünnt, um gleiche Proteinkonzentrationen pro Probe auf das Gel aufzutragen.

Die Elektrophorese wurde in einer Anlage von Biometra (Whatman Biometra, Göttingen) durchgeführt. Die Gelplatten hatten eine Größe von 14 x 15 cm. Die Durchführung der Elektrophorese richtete sich im wesentlichen nach dem Handbuch von Amersham (Amersham Biosciences, Freiburg).

Vor dem Gießen wurden die Glasplatten mit Mucosol gereinigt und mit Wasser bzw. Ethanol abgespült. Die Lösungen für die Elektrophoresen wurden nach Vorschrift von Amersham (Amersham Biosciences, Freiburg) angesetzt (Tabelle 3). Es wurde ein 10 %iges Acrylamid-Trenngel (Lämmli 1970) gegossen (Tabelle 4), mit wassergesättigtem Butanol überschichtet und 1 Stunde zum Polymerisieren stehen gelassen. Danach wurde das Butanol durch Dekantieren und Nachreinigen mit Aqua bidest entfernt. Das Trenngel wurde für die Zeit des Ansetzens der Sammelgellösung mit einem sogenannten Resolving gel overlay (Tabelle 3) überschichtet. Diese Lösung wurde wieder dekantiert und das Sammelgel (Tabelle 4) gegossen. Es stand etwa 30 min zum Polymerisieren. Währenddessen wurde die Elektrophoreseanlage auf 10 °C vorgekühlt. Die verdünnten Proteinproben (2,5 µg/Tasche) wurden mit Ladepuffer (Tabelle 3) 1:1 gemischt, 3 min bei 70 °C inkubiert und aufgetragen. Als Marker diente ein Proteinkit (LMW 17-0446-01, Amersham Bioscience, Freiburg). Die Elektrophorese erfolgte bei 20 mA pro Gel (Power Pac 3000, Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland). Die Gele wurden nach Blum et al. (1987) mit Silber (siehe 3.3.5.3) gefärbt.

**Tabelle 3** Für die eindimensionalen Elektrophorese verwendeten Puffer und deren Zusammensetzung.

Lösung	Zusammensetzung
Trenngelpuffer	1,5 M Tris; pH 8,8
Sammelgelpuffer	0,5 M Tris; pH 6,8
Resolving gel overlay	0,375 M Tris-Cl; 0,1 % SDS; pH 8,8
Probenpuffer	0,125 M Tris-Cl Puffer; 4 % SDS; 20 % glycerol; 0,2 M DTT; 0,02 % Bromphenolblau
Laufpuffer	0,025 M Tris; 0,192 M Glycin; 0,1 % SDS; pH 8,3

**Tabelle 4** Pipetierschema zur Herstellung vom SDS-Gelen

Stammlösung	Trenngel	Sammelgel
Acrylamid	10,013 ml	2,66 ml
Trenngelpuffer	7,5 ml	x
Sammelgelpuffer	x	5 ml
10 % SDS	0,3 ml	0,2 ml
dd H <sub>2</sub> O	12,04 ml	12 ml
10 % APS	0,15 ml	0,1 ml
TEMED	10,125 µl	10 µl

### 3.3.5 Zweidimensionale Elektrophorese

#### 3.3.5.1 Proteinaufreinigung

Die zweidimensionale Elektrophorese wurde mit Proben aus dem Trockenstressversuch II durchgeführt. Dazu wurden je drei gestresste – und drei Kontrollpflanzen der Kreuzung 15044 nach 14 Tagen ohne Bewässerung verwendet. Des weiteren wurden jeweils vier Kontrollen der Vollgeschwister 15044 und 15046 mittels 2-D-Elektrophorese vergleichend untersucht. Zudem wurden Arabidopsisblätter von Kontrollpflanzen der Nachkommen aus verschiedenen Kreuzungsumgebungen auf ihr Proteinspektrum analysiert.

Die Elektrophoresen wurden mit allen Proben mindestens dreimal wiederholt, um signifikante Veränderungen zu erkennen.

Die Proteine wurden nach der Vorgabe von Damerval et al. (1986) aufgereinigt. Dazu wurden Nadeln und Blätter in flüssigem Stickstoff gemörsert, und 0,5 bis 1 g des Pulvers in ein Zentrifugenröhrchen eingewogen. Der Ansatz wurde mit 5 ml 10 %iger TCA w/v in Aceton mit 0,07 % v/v Mercapthoethanol versetzt und gründlich gemischt. Das Gemisch wurde über Nacht bei –20 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Ansätze bei 41700 g und 4 °C zentrifugiert (Beckman J2-HS, Beckman Coulter GmbH, Krefeld). Der Überstand, der Chlorophyll enthielt, wurde verworfen und das Pellet mit 10 ml eiskaltem (-20 °C) Aceton mit 0,07 % v/v Mercapthoethanol gemischt. Dieser Ansatz wurde noch einmal für 1 h bei –20 °C inkubiert und danach wie oben zentrifugiert. Wieder wurde der Überstand verworfen und das Pellet mindestens fünfmal mit 10 ml eiskaltem Aceton gewaschen. Dazwischen wurde jeweils zentrifugiert und der Überstand verworfen. Am Ende wurde das Pellet unter Vakuum 5 bis 10 min getrocknet und bei –20 °C gelagert.

### 3.3.5.2 2-D-Elektrophorese

Von den aufgereinigten Proteinpellets wurden 10 mg bzw. 5 mg in ein Reaktionsgefäß eingewogen, je nachdem ob später eine Coomassie- oder Silberfärbung geplant war. Die Proteinpellets wurden mit 500 µl bzw. 1000 µl frisch angesetztem Rehydrationspuffer [8 M Harnstoff, 0,5 % w/v CHAPS, 15 mM DTT, 0,2 % v/v IPG Puffer pH 3-10 und 0,2 % v/v Bromphenolblau (Görg and Weis 2000)] versetzt. Diese Mischverhältnisse (10 mg/500 µl für Coomassie und 5 mg/1000 µl für Silber) haben sich nach einigem Probieren als die günstigsten herausgestellt, um die meisten Spots auf den Gelen unter den jeweiligen Färbebedingungen sichtbar zu machen. Die Ansätze wurden 30 min bei Raumtemperatur geschüttelt und anschließend bei 12073 g und 4 °C zentrifugiert (Mikro 24-28R, Hettich, Tuttlingen). Die Proteinkonzentration wurde mit einer modifizierten Lowry-Methode nach Peterson (1977) bestimmt. 400 µl des Überstands wurden zunächst 1:1 verdünnt und in 3 Parallelen zu je 200 µl in Reagenzröhrchen verteilt. Diese wurden auf 1 ml mit dd H<sub>2</sub>O aufgefüllt. Der Ansatz wurde mit 0,1 ml 0,15 % DOC für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das Gemisch wurde mit 0,1 ml 72% w/v TCA versetzt und bei 3000 g für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und TCA-Reste gründlich auf Filterpapier abgetropft. Das Pellet wurde in 1 ml dd H<sub>2</sub>O gelöst und mit 1 ml des Nachweisreagenz A (besteht aus gleichen Teilen Kuper-Tartrat-Carbonat, 10% SDS, 0,8 M NaOH und dd H<sub>2</sub>O) bei Raumtemperatur für 10 min inkubiert. Dann wurde das Nachweisreagenz B (20 % v/v Folin-Ciocalteuphenolreagenz) hinzugefügt und der Ansatz weitere 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Messung erfolgte am Photometer bei  $\lambda = 750$  nm. Die Bestimmung der Konzentration erfolgte mit Hilfe einer Eichkurve aus Rinderserumalbumin.

Die folgenden Schritte wurden, soweit nicht anderes angegeben, unter der Verwendung der Geräte bzw. Chemikalien von der Firma Amersham Bioscience (Freiburg) durchgeführt. Es wurden 350 µl des oben gewonnenen Überstandes abgenommen und in einen Stripholder gefüllt. IPG-Strips mit immobilisierten, linearen pH-Gradient (Immobiline DryStrip, 180 mm x 3 mm x 0,5 mm, pH 3-10 oder pH 4-7) wurden vorsichtig mit der Gelseite nach unten in die Lösung eingetaucht und mit 1 ml einer öligen Lösung (plus one Dry Strip Cover Fluid) überschichtet, um ein Austrocknen der Proben zu verhindern. Die isoelektrische Fokussierung wurde in der Ettan IPGphor – Einheit unter folgenden Bedingungen durchgeführt (siehe auch die Betriebsanleitung von Amersham oder Görg et al. 2000): Rehydrierung 12 h mit 20 V, dann 2 h mit 150 V, 1 h mit 200 V, 1 h mit 500 V,

dann konstant 1000 V für 1000 Vh und anschließend eine lineare Erhöhung der Spannung auf 8000 V. Zum Schluss wurde die Spannung von 8000 V gehalten, damit die Proteine in ihrer Position blieben. Nach der isoelektrischen Fokussierung können die Strips bis zur weiteren Verwendung bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  eingefroren werden.

Die Glasplatten für die Trenngele wurden mit Viss Glasreiniger gereinigt und über Nacht getrocknet. Je zwei Glasplatten wurden zusammengelegt, in der Gießkassette gestapelt und die Kassette mit Klemmen luftdicht verschlossen. Für die zweite Dimension wurden sechs 12 %ige Acrylamid-Gele (Lämmli 1970) gegossen. Die Trenngellösung bestand aus 41 % v/v Acrylamidlösung (30,8 %), 25 % v/v Trenngelpuffer (1,5 M Tris HCl, pH 8,8, 0,4 % SDS), 5 % v/v Glycerol und dd H<sub>2</sub>O in 502 ml. Dieser Lösung wurde zum Polymerisieren 250  $\mu\text{l}$  TEMED (10 %) und 4 ml APS (10%) hinzugefügt und 1-2 min gerührt. Die Trenngellösung wurde zügig über einen Schlauch mittels eines Gefälles in die Gelkassette gegossen und mit der danach applizierten Verdrängungslösung (0,375 M Tris, 30 % v/v Glycerol, 0,001 % Bromphenolblau) nach oben geschoben. Die Gele wurden mit wassergesättigtem Butanol überschichtet und polymerisierten über Nacht.

Die Strips wurden für die zweite Dimension äquilibriert. 125 ml Äquilibrierungspuffer (6 M Harnstoff, 30 % (w/v) Glycerol, 2 % (w/v) SDS) wurde am Tag vorher angesetzt. Die Äquilibrierung erfolgte in zwei Schritten. Im ersten Schritt wurden 10 ml Äquilibrierungspuffer mit 1 % w/v DTT pro Strip appliziert und 15 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Das DTT diente dazu die Proteine in ihrem reduzierten Zustand zu erhalten. Der Überstand wurde verworfen und der Schüttelvorgang mit 10 ml Äquilibrierungspuffer mit 4 % w/v Iodacetamid wiederholt. Iodacetamid verhindert durch Alkylierung der Thiol-Gruppen eine Reoxidation der Proteine während der Elektrophorese. Diese Lösung wurde ebenfalls verworfen. Die Strips wurden mit dd H<sub>2</sub>O kurz gespült, mit Filterpapier getrocknet, in zweifach konzentriertem Elektrophoresepuffer (Glycin 0,192 M, Tris 0,025 M, 0,1 % SDS) getaucht und vorsichtig mit Hilfe eines Spatels zwischen die Glasplatten geschoben. Die Strips wurden mit 0,5 %-iger, flüssiger Agarose, gelöst in einfach konzentriertem Elektrophoresepuffer (Glycin 0,192 M, Tris 0,025 M, 0,1 % SDS), überschichtet.

Markerproteine eines Standardkits (LMW 17-0446-01) wurden zuvor wie folgt angesetzt: die Proteine wurden in Probenpuffer (siehe 3.3.4 eindimensionale Elektrophorese) aufgenommen und, falls eine Silberfärbung geplant war, 1:20 verdünnt. Für Coomassie-Färbung blieb der Ansatz unverdünnt. 5-10  $\mu\text{l}$  des Gemisches wurden auf Filterpapierstücke (5 x 5 mm) pipettiert, mit der 0,5 %-iger leichtschmelzender Agarose

(Agarose NA) überschichtet und als Sechserpacks in 1,5 ml Reagenzgefäßen weggefroren. Je ein Filterstück wurde auf der Seite des positiven Pols neben dem Strip platziert.

Die Trennung der Proteine nach Größe erfolgte in einer Ettan Dalt six Einheit unter folgenden Bedingungen: 3000 V/ 400 mA/ 013 W für 30 min und 3000 V/ 400 mA/ 100 W für 4-5 h (Power Pac 3000, Bio-Rad Laboratories, München). Hierfür wurden 1 l eines zweifach konzentrierten und 5 l eines einfach konzentrierten Elektrophoresepuffers (Glycine 0,192 M, Tris 0,025 M, 0,1 % SDS) für den oberen und den unteren Tank der Anlage benötigt. Die Trennung dauerte ungefähr 4,5 h.

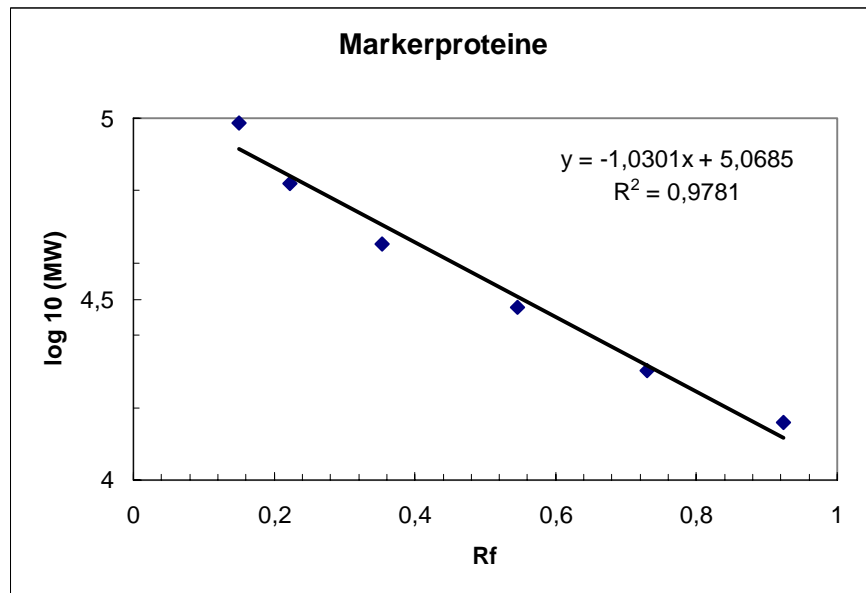
### 3.3.5.3 Gelfärbung

Nach der Elektrophorese wurden die Gele für die Silberfärbung über Nacht fixiert (50% v/v Ethanol, 12% v/v Eisessig, 0,05% v/v 37%iges Formaldehyd) und am nächsten Tag nach Blum et al. (1987) gefärbt. Die Färbung von je zwei Gelen erfolgte bei Raumtemperatur in 500 ml Lösung. Die Gele wurden 3 x 20 min mit 30% v/v Ethanol gewaschen, dann 1 min mit 0,02% w/v Natriumthiosulfatpentahydrat, 3 x 20 s mit dd H<sub>2</sub>O und dann 20 min in einer Färbelösung aus 0,2% w/v Silbernitrat und 0,075% v/v 37%igem Formaldehyd geschüttelt. Anschließend wurden die Gele noch einmal mit dd H<sub>2</sub>O 2 x 20 s gewaschen und mit einem Entwickler (60 % w/v Natriumcarbonat, 0,0004 % w/v Natriumthiosulfatpentahydrat, 0,05% v/v 37%iges Formaldehyd) gefärbt. Die Färbung wurde nach 1-5 min durch Austausch des Entwicklers gegen eine Stopplösung (50 mM EDTA) beendet.

Die kolloidale Coomassie-Blau-Färbung erfolgte nach Neuhoff (1990). Die Gele wurden über Nacht in 500 ml Färbelösung (0,1 % w/v CBB G-250 Stammlösung, 1,6 % w/v Phosphorsäure (85%), 8 % Ammoniumsulfat, 20 % v/v Methanol) unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurde der Hintergrund durch mehrmaliges Austauschen mit dd H<sub>2</sub>O entfärbt.

Die Gele wurden einzeln gescannt (Fluors-Multiimager, Biorad, München) und die Bilder per Auge verglichen. Die silbergefärbten Gele dienen zu einer generellen Übersicht über das Muster der löslichen Proteine und zur Erkennung von Veränderungen durch Umwelteinflüsse während der Kreuzung (warm/kalt). Die Coomassiegele dienen dazu, signifikant veränderte Spots zu picken und zu analysieren. Silbergefärbte Spots können nur schwer analysiert werden, da das Silber stört.

Das Molekulargewicht der Proteine wurde basierend auf der Laufweite und Größe der Markerproteine berechnet (siehe Abbildung 6). Der isoelektrische Punkt wurde durch die Distanz der Spots zu pH 3 und pH 10 berechnet.



**Abbildung 6** Eichgerade zur Bestimmung der Molekulargewichte der Proteinspots. Es ist der Quotient von Laufweite der Markerproteine zur Laufweite der Lauffront ( $R_f$ ) gegen den Logarithmus ihrer Molekulargewichte aufgetragen ( $\log MW$ ).

### 3.3.5.4 Proteinverdau und Proteinidentifizierung

Der Proteinverdau erfolgte nach dem Protokoll von Havlis et al. (2003). Hierzu wurden die einzelnen mit Coomassie gefärbten Proteinspots auf einer sauberen, fusselreifen Glasplatte mit einer abgeschnittenen Pipettenspitze (1000  $\mu$ l) aus dem Gel ausgestochen und in ein 0,5  $\mu$ l PCR-Gefäß (Sarstedt, Nümbrecht) überführt. Die großen Gelstücke wurden zudem noch einmal mit einer sauberen Rasierklinge klein geschnitten, um ein besseres Diffundieren des Trypsins in das Gel zu ermöglichen. Die Gelstücke konnten so bis zur weiteren Analyse bei  $-20$  °C gelagert werden.

Für den Verdau wurden bis zu 10 Proben parallel bearbeitet und zweimal für 15 min mit 200  $\mu$ l dd H<sub>2</sub>O bei Raumtemperatur gewaschen. Dem folgten ein bis zwei Waschschrte à 15 min (je nach Blaufärbung der Spots) mit 200  $\mu$ l 50 %igem Methanol und ein zwanzigminütiges Waschen mit reinem Acetonitril. Die Waschlösungen wurden zwischen den einzelnen Schritten verworfen und das restliche Acetonitril unter Vakuum abgedampft. Trypsin wurde in 86  $\mu$ l Resuspensionspuffer (Promega) gelöst und mit 50 mM Ammoniumhydrogencarbonat (pH 8,0) 1:5 verdünnt. Je nach Größe des Gelstückes wurden 15-20  $\mu$ l Trypsinlösung direkt auf das Gel gegeben und für 10 min auf Eis

inkubiert. Dann wurde kontrolliert, ob die Gelstücke von der Flüssigkeit ausreichend bedeckt waren, sonst wurden noch bis zu 10 µl nachpipettiert. Der Ansatz stand dann für eine Stunde bei 4 °C (Kühlschrank), um eine vollständige Aufnahme des Trypsins durch die Gelstücke zu erreichen. Dann kam er für 30 min in ein Wasserbad bei 58 °C, um die Spaltung der Proteine durch das Trypsin zu induzieren. Der Verdau wurde durch die Zugabe von 200 µl 5 % v/v Ameisensäure gestoppt. Die Proben wurden für 30 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Die Überstände wurden in ein neues PCR-Gefäß (Eppendorf, Hamburg) überführt, die Gelstücke mit 200 µl 50% v/v Acetonitril und 5% v/v Ameisensäure versetzt und wie vorher geschüttelt. Die Überstände wurden vereinigt und in einer Vakuumzentrifuge eingengt (SPD speed vac, Thermo Savant, Holbrook, USA). Danach konnten die Proben bei -20°C gelagert werden.

Für die flüssigkeitschromatographische Auftrennung wurden die Proben in 5 µl 0.1% v/v Ameisensäure gelöst. Davon wurden 4 µl auf eine 180 cm lange Kapillarsäule, gepackt mit 218MS-C18 Substanz (Vydac, Columbia, USA), injiziert und mit Hilfe einer ESI-LC-MS (HP 1100 Agilent, Palo Alto, USA; Esquire 3000, Bruker Daltonik, Bremen) aufgetrennt. Die Trennung der Peptide erfolgte in einem Gradienten aus 0,1 % Ameisensäure (Solvent A) und 95 % Acetonitril in 0,1 % Ameisensäure (Solvent B): 20 min 2 % Solvent B, gefolgt von einem Gradienten aus 50 % Solvent B in 45 min, dann 95 % Solvent B für 3 min und anschließend weitere 10 min in 95 % B. Die Ionisation der Peptide erfolgte mit Hilfe der Elektrosprayionisation (ESI). Massenspektren wurden mit einem Ionenfallen-Massenspektrometer (Esquire 3000, Bruker Daltonik, Bremen) aufgenommen. MS 1 und MS 2 Spektren wurden mit der Data Analysis Software (Bruker Daltonik) analysiert. Die erhaltenen Daten wurden für die Proteinidentifizierung mittels Mascot Software (Matrix – Science, Boston, USA) und die Recherche in MSDB-, NCBI- bzw. EST-Datenbanken verwendet.

### 3.3.6 C/N Analyse

Der C/N-Gehalt wurde mit Hilfe eines Elemental Analyser EA-1108 (Carlo Erba Instruments, Rodano, Italien) bestimmt. Dafür wurden Arabidopsissamen getrocknet, in einer Mühle (Typ MM 2, Retsch, Haan) zu feinem Pulver gemahlen und 0,8 mg in eine Zinnkapsel (HEKAtech GmbH, Wegberg) eingewogen. Die Proben wurden in einen Probenhalter des Elementanalysators gegeben. Die einzelne Probe fällt zum Messen in das Verbrennungsrohr. Im Verbrennungsrohr wird durch Zugabe von Sauerstoff die Probe bei 1020 °C verbrannt. Der im Verbrennungsrohr befindliche Oxidationskatalysator (Chrom-

III-Oxid) zerlegt die Stoffe oxidativ, wobei das ebenfalls im Rohr befindliche reduzierte Kupfer oxidiert wird und die zerlegten Stoffe zu  $N_2$ ,  $CO_2$  und  $H_2O$  reduziert werden. Diese Elemente laufen durch ein an das Verbrennungsrohr angeschlossenes Oxidationsrohr und werden anschließend auf einer Chromatographiesäule getrennt. Ein an die Säule angeschlossener Wärmeleitfähigkeitsdetektor gibt elektrische Signale der aufgetrennten Elemente an einen Integrator weiter. Der Integrator erzeugt je nach Stärke der empfangenen Signale Peaks. Anhand der Peakflächen, konnten die Konzentration von Stickstoff und Kohlenstoff gegen eine Standardsubstanz (Acetanilid,  $C_8H_9NO$ ) berechnet werden.

### 3.3.7 Kohlenhydratbestimmung

Die Kohlenhydratbestimmung erfolgte nach Carrol et al. (1956) in abgewandelter Form. Ca. 30 mg Samenmaterial von Arabidopsis wurde in 1,5 ml Reaktionsgefäße mit Schraubverschluss eingewogen und sofort mit 1 ml dd  $H_2O$  aufgenommen. Das Gemisch wurde 5 min bei 100 °C gekocht und anschließend 5 min bei 8900 g zentrifugiert. Der Überstand wurde in 10 ml Polypropylenröhrchen (PP Röhrchen) auf 1 ml verdünnt (3 Parallelen), mit 4 ml Anthronreagenz (0,05 % w/v Anthron, 1 % w/v Thioharnstoff in 70 %  $H_2SO_4$ ) versetzt und gut gemischt. Der Ansatz wurde 15 min bei 100 °C im Wasserbad inkubiert und anschließend sofort im Eisbad abgekühlt, um die Reaktion zu stoppen. Die Extinktion wurde bei Raumtemperatur bei  $\lambda = 620$  nm gemessen. Die Berechnung erfolgte nach einer Standardkurve mit 0,5 mmol Fructose. Diese Eichkurve entstand aus den Extinktionen der Verdünnungen 0 mmol/l, 0,05 mmol/l, 0,1 mmol/l, 0,2 mmol/l, 0,4 mmol/l und 0,5 mmol/l Fructose.

Zur genaueren Untersuchung einzelner Komponenten wurde eine enzymatische Zucker- und Stärkebestimmung durchgeführt (Beutler 1978, Schopfer 1989). Dazu wurden die Kohlenhydrate aus 75 mg gemörsertem Samenpulver durch Kochen mit DMSO/HCl 25 % (80:20, v:v) herausgelöst. Der daraus resultierende Extrakt wurde mit kaltem Citratpuffer (pH 10,6) 1:6 verdünnt. Dieser Ansatz wurde wiederum 1:1 mit 50  $\mu$ M Citratpuffer (pH 4,6) versetzt und auf Eis gestellt. 100  $\mu$ l dieses Gemisches wurden mit 250  $\mu$ l einer Reaktionslösung (4 mM NaDP, 10 mM ATP, 9 mM  $MgSO_4$ , 0,75 M Triethanoamin, pH 7,6) und 400  $\mu$ l dd  $H_2O$  zusammengebracht. Dieser Ansatz stand 2 min bei 25 °C im Dunkeln und die Extinktion E1 wurde bei  $\lambda = 340$  nm gemessen. Nach Zugabe von Hexokinase-Glucose-6P-Dehydrogenase zu diesem Gemisch und erneuter Inkubation für



5 min im Dunkeln bei 25 °C wurde die Extinktion E2 bei  $\lambda = 340$  nm gemessen. Das gleiche Verfahren wiederholte sich nach Zugabe von Phosphoglucoseisomerase (PGI) und die Extinktion E3 wurde photometrisch aufgenommen. Die Proben wurden danach zwischenzeitlich aus den Küvetten in Reaktionsgefäße überführt mit 10  $\mu$ l Fructosidase versetzt und 30 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Die Proben wurden zurück in die Küvetten überführt und die Extinktion E4 bei  $\lambda = 340$  nm und 25 °C gemessen. Die Stärkemessung erfolgte unter Zugabe von Amyloglucosidase in den DMSO/Citratpufferextrakt. Der Ansatz kam für 20 min in ein 57 °C Wasserbad und dann auf Eis zum Abkühlen. Danach wurden 100  $\mu$ l dieser Probe mit 250  $\mu$ l einer Reaktionslösung und 400  $\mu$ l dd H<sub>2</sub>O versehen, 2 min bei 25 °C inkubiert und die Extinktion bei  $\lambda = 340$  nm bestimmt. Dann wurde Hexokinase-Glucose-6P-Dehydrogenase dem Gemisch zugegeben, 5 min bei 25 °C inkubiert und eine zweite Extinktionsmessung bei 340 nm durchgeführt. Parallel zur Zucker- und Stärkebestimmung wurden immer Standards aus Glucose bzw. Stärke mitgeführt, um zu prüfen, ob die Methode richtig funktionierte. Die Berechnung der Konzentrationen erfolgte nach dem Lambert-Beerschen-Gesetz und wurde auf das eingewogene Frischgewicht des Samenpulvers bezogen.

### **3.3.8 Lipidbestimmung**

Die Bestimmung der Lipide erfolgte wie in op den Camp et al. (2003) beschrieben und wurde am Albrecht-Haller Institut für Pflanzenwissenschaften in der Abteilung 1 Biochemie der Pflanze (AG Prof. Feußner) an der Georg August Universität Göttingen durchgeführt.

## **3.4 Molekularbiologische Analysen**

### **3.4.1 RNA-Isolierung**

Für molekularbiologische Analysen wurden Blattproben von Arabidopsis aus den Kältestressversuchen verwendet. Von den jeweils 7 Einzelproben pro Stress bzw. Kontrolle und Kreuzungsumgebung, wurden je zwei Blattproben zu einer Mischprobe vereinigt. Es entstanden pro Variante drei Mischproben. Diese wurden in einer Retschmühle (Typ MM2, Retsch GmbH, Haan) mit flüssigem Stickstoff gemahlen.

Aliquots von 500 mg wurden in 2 ml Reaktionsgefäßen (Eppendorf, Hamburg) eingewogen und bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  eingelagert.

Die RNA-Isolierung orientiert sich an der Vorschrift von Chang et al. (1993) und wurde in zwei Hauptschritten an zwei Tagen durchgeführt. In 10 ml PP-Röhrchen (Sarstedt) wurden je 3 ml CTAB-Puffer (2 % CTAB, 10 % Tris HCl pH 8,8, 25 mM EDTA, 2,0 M NaCl, 2 % PVP) mit je 60  $\mu\text{l}$  Mercapthoethanol vereinigt und kurz im Wasserbad bei  $65^{\circ}\text{C}$  erwärmt. 500 mg gemörsertes, tiefgefrorenes Blattmaterial wurden hinzugegeben, gut geschüttelt und bei  $65\text{ }^{\circ}\text{C}$  im Wasserbad für 15 min inkubiert. Das Gemisch wurde 15 min bei Raumtemperatur auf einem Flachsüttler (GFL, Burgwedel, 250 Upm) weitergeschüttelt, mit 3 ml Chloroform/Isoamylalkohol (25:1) versetzt und weitere 15 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend wurde bei Raumtemperatur zentrifugiert (15 min, 6000 g, Minifuge RF IL-Nr 1709, Heraeus Sepatech, Langenselbold). Die obere Phase wurde abgenommen, ein weiteres mal mit Chloroform/Isoamylalkohol versetzt, geschüttelt und zentrifugiert. Wieder wurde die obere Phase abgenommen, deren Volumen bestimmt und das 0,25-fache an 10 M Lithiumchlorid ( $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) zugegeben. Die Proben wurden über Nacht auf Eis im Kühlschrank inkubiert.

Am nächsten Tag wurden die Proben für 20 min zentrifugiert (12000 g,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  Centrifuge 5417 R, eppendorf, Hamburg). Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet in 400  $\mu\text{l}$  SSTE (0,5 % SDS, 10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA pH 8,0, 1,0 M NaCl) bei  $65\text{ }^{\circ}\text{C}$  im Wasserbad für 5 min gelöst. Dabei wurde die Probe zwischenzeitlich geschüttelt. Die Lösung wurde in 2 ml Reaktionsgefäße (Eppendorf) überführt. Dann erfolgten zwei Aufreinigungsschritte mit je 400  $\mu\text{l}$  Chloroform/Isoamylalkohol und anschließender Zentrifugation bei Raumtemperatur (15300 g, 5 min, Eppendorf centrifuge 5417 R, Eppendorf, Hamburg). Die daraus resultierenden Überstände wurden in jeweils neue 1,5 ml Reaktionsgefäße (Eppendorf) überführt. Der letzte Überstand wurde mit der zweifachen Volumenmenge an eiskaltem ( $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) 90%igem Ethanol versetzt und für 2 h bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Gefrierschrank, Liebherr, Ochsenhausen) inkubiert. Die Probe wurde danach für 20 min bei  $4^{\circ}\text{C}$  und 15300 g zentrifugiert (Eppendorf centrifuge 5417 R, Eppendorf, Hamburg) und der Niederschlag zweimal mit 70%igem Ethanol gewaschen, dazwischen jeweils kurz zentrifugiert. Das Pellet wurde in der SpeedVac (Eppendorf concentrator, Eppendorf, Hamburg) bei  $45\text{ }^{\circ}\text{C}$  3-5 min getrocknet und in 50  $\mu\text{l}$  RNase freiem Wasser (Ambion, Woodward, USA) aufgenommen. Die Proben wurden bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

### 3.4.2 Filterhybridisierung

Es wurden je eine RNA-Probe von Kontrollpflanzen aus warmer und kalter Kreuzungsumgebung für die Filterhybridisierung verwendet. Die Filter wurden innerhalb des REGIA-Projektes in Bielefeld (Arbeitsgruppe Prof. Bernd Weishaar) angefertigt und enthielt ca. 1400 Transkriptionsfaktoren von Arabidopsis, die unter Pathogenstress reguliert werden oder in Entwicklungsprozessen und Signaltransduktionswegen eine Rolle spielen. Die Hybridisierung erfolgte nach der Methode von Herde (2003) und wurde im Albrecht von Haller Institut für Pflanzenwissenschaften der Universität Göttingen in der Abteilung 2: Allgemeine Entwicklungsphysiologie der Pflanze (AG Prof. Gatz) durchgeführt. Dabei wurde die RNA in radioaktive cDNA-Sonden umgeschrieben und auf den Filtern hybridisiert. Es wurde radioaktiver Phosphor ( $^{33}\text{P}$ ) verwendet.

Die Filter wurden 3h, 24 h, 3 d und 8 d auf Platten (Fuji Imaging Plate, Raytest, Straubenhardt) aufgelegt und in einer Bleiburg inkubiert. Dann wurden sie über einen Phosphoimager (BAS-1500 Bioimaging Analyzer, Raytest, Straubenhardt) gescannt, mit der Aida Software Version 4.06 (Raytest, Straubenhardt) geladen und als Bilddatei abgespeichert.

Die Bilddateien der Filter wurden als Fuji-Bas-Format geladen und mit dem Programm Array Vision <sup>TM</sup> Version 8.0 (Imaging Research Inc.) ausgewertet. Dabei diente der Filter mit der Probe aus 15 °C als Referenz für den Filter mit der Probe aus 25 °C. Die relative Expression wurde als  $\text{Signal Probe}_{25}/\text{Signal Probe}_{15}$  ermittelt. Der Quotient sollte einen Wert von größer oder gleich 3 haben, um auf eine signifikante Veränderung hinzudeuten. Aus der Liste der potentiell regulierten Gene wurden 4 für die Überprüfung mittels quantitativer Real-Time PCR ausgewählt.

### 3.4.3 RNA Aufreinigung und cDNA Synthese

Vor der Real Time PCR war eine Aufreinigung der RNA nötig, um Verunreinigungen mit DNA zu beseitigen. Die DNA wurde mit einer Desoxyribonuclease I (DNase I) gemäß der Firmenanleitung (EN0521, Fermentas, St. Leon-Roth) verdaut. Dazu werden 25 µg isolierte RNA mit nuclease freiem Wasser auf 225 µl aufgefüllt. Dieser Ansatz wird mit 25 µl 10X Reaktionspuffer (mit  $\text{MgCl}_2$ ) und 25 µl DNase I versetzt, gemischt und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe von 25 µl EDTA und 10 min im 65 °C heißen Thermoblock ist die DNase inaktiviert.

Danach wurde die RNA über RNeasy-Minisäulen nach RNA Cleanup Protokoll (74104, Qiagen, Hilden) weiter aufgereinigt. Hierzu wurden die 300 µl einer jeden Probe aus der

vorhergehenden Reaktion zu je 100 µl auf 3 Reaktionsgefäße (Eppendorf) verteilt. Jede Probe wurde mit 350 µl RLT-Puffer versetzt, gemischt, dann mit 250 µl Ethanol (96-100 %) versetzt und wieder gemischt. Dieser Ansatz (700 µl) wurde auf die Säulen gegeben, 15 s bei 8000 g zentrifugiert und das Filtrat verworfen. Die RNA befand sich auf der Säule. Die zwei weiteren Parallelen einer Probe wurden nach und nach auf die gleiche Säule gegeben und 15 s bei 8000 g abzentrifugiert. Die Säule wurde 2 x mit 500 µl RPE-Puffer gewaschen. 30 µl RNase freies Wasser wurde auf die Membran pipettiert und die RNA mittels Zentrifugation von 1 min bei 14000 g von den Säulen abzentrifugiert. Die RNA-Qualität und Quantität wurde am Photometer (BioPhotometer, Eppendorf, Hamburg) bestimmt. Dabei wurden 2 µl Probe mit 78 µl nuclease freiem Wasser vereinigt und Extinktionen bei 230 nm, 260 nm und 280 nm gemessen.

Die aufgereinigte RNA wurde zur cDNA Synthese mit einem Bio-Rad Kit (170-8890, Bio-Rad, München) eingesetzt. Dabei wurden nach Firmenprotokoll 5 µg RNA mit RNase freiem Wasser auf 30 µl aufgefüllt und 8 µl 5x iScript Reaktionsmix bzw. 2 µl iScript Reverse Transkriptase dazugegeben. Die PCR lief über Nacht.

### **3.4.4 Real Time PCR**

Die vier ausgewählten Gene für die Real Time PCR waren: Flavanon-3-hydroxylase (FH3), ein RAP 2.3 Protein, welches eine AP2 Domäne beinhaltet, ein pseudo-reponse-regulator 9 Gen und ein No apical meristem (NAM) Protein (Tabelle 5). Für die Real Time PCR wurden die Primersequenzen für diese Gene mit Hilfe des Primer 3 Input Programms (siehe gleichnamige Homepage) konstruiert. Primerprodukte von einer erwarteten Größe von rund 200 bp wurden von der Firma MWG Biotech (Ebersberg) hergestellt.

**Tabelle 5** Primer der vier ausgewählten Transkriptionsfaktoren mit der erwarteten Produktgröße.

AGI-Code	Name	Primer	Produktgröße (bp)	T <sub>m</sub> in °C
At3g51240	Flavanon-3-hydroxylase (F3H)	5' gtggcggatatgactcgtct 3' cgctactttcaccacaacctt	228	59,4 57,3
At3g16770	RAP 2.3, das eine AP 2 Domäne enthält	5' gagggatacgtgaagcgtcca 3' gcagatctgggaagttgagc	174	59,4 59,4
At2g46790	pseudo response Regulator 9 Gen	5' gtggaattgacaagcgtcct 3' aagccaagctcaggaccaa	77	57,3 57,3
At1g69490	No apical meristem (NAM) Protein	5' cccgagaaaacagagtttg 3' cgttacttgaaccgctgtga	154	57,3 57,3

Mittels PCR wurde geprüft, ob mit den Primern die angegebenen Produktgrößen amplifiziert wurden. Die PCR wurde mit Hilfe eines Mastercyclers (Eppendorf, Hamburg) durchgeführt. Die Proben wurden nach dem Pipettierschema in Tabelle 6 angefertigt. Es wurde eine cDNA Probe für diese Überprüfung ausgewählt und davon 0,5 µl in den Mastermix dazu pipettiert. Als Kontrolle diente eine Wasserprobe ohne cDNA, um eventuelle Verunreinigungen der restlichen Substanzen zu detektieren. Das PCR-Standardprogramm wurde programmiert und gestartet (Tabelle 7). Dabei wurden die Schritte 2 bis 4 35 mal wiederholt. Dies ergab insgesamt 36 Zyklen. Die Produkte wurden auf 2 %ige Agarosegelen aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt.

**Tabelle 6** Pipettierschema für PCR

Name	Stocklösung	Menge µl
PCR-Puffer (Tris-Cl, KCl, (NH <sub>4</sub> )SO <sub>4</sub> , 15 mM MgCl <sub>2</sub> , pH 8,7)	10 x	2,5
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	1,5
dNTP-Mix	10 mM	0,5
Primer 5'	10 µM	2
Primer 3'	10 µM	2
nuclease freies Wasser		15,875
HotStarTaq		0,125
Gesamt		25

**Tabelle 7** Ablaufschema der PCR

Schritt	Prozess	Temperatur	Zeit
1	HotStarTaq aktiviert	95 °C	15 min
2	Denaturierung	94 °C	1 min
3	Annealing	56 °C	1 min
4	Elongation	72 °C	1 min
5	gehe zu Schritt 2, Wdh. 35 x		
6	Finale	72 °C	10 min
7	Abkühlen und konstante Temp.	4 °C	

Die Real-Time PCR wurde mit dem iCycler + MyiQ Single Color Real Time PCR Detection System (Bio-Rad, München) durchgeführt. Die Proben wurden nach dem Schema in Tabelle 8 auf eine Probenplatte (PCR 96er Well, Greiner bio-one, Frickenhausen) pipettiert. Die Platte wurde mit einer Abdeckfolie (Greiner bio-one, Frickenhausen) abgedichtet. Der Ansatz wurde 3 min bei 1600 g zentrifugiert (Centrifuge 5810R, Eppendorf). Die Proben kamen anschließend in das iCycler + MyiQ Single Color Real Time PCR Detection System. Der Programmablauf der PCR wird in Tabelle 9 dargestellt. Die relative Expression der vier untersuchten Gene wurde mit dem Programm „Relative expression software tool (REST©)“ berechnet und statistisch ausgewertet (Pfaffl 2001, Pfaffl et al. 2002). Als Referenz diente die gesamte Transkriptmenge der 18 S rRNA. Dabei wurde die relative Genexpression sowohl innerhalb der Kontrollen als auch innerhalb der gestressten Pflanzen aus den verschiedenen Kreuzungsumgebungen verglichen. Außerdem wurden die Genexpression zwischen gestressten Pflanzen und Kontrollen innerhalb der Nachkommen aus warmer und kalter Kreuzungsumgebung miteinander verglichen.

**Tabelle 8** Pipettierschema für die Proben für Real Time PCR

<b>Name</b>	<b>Menge</b>
cDNA	2 µl
2x Bio-Rad-Mix (170-8880)	12,5 µl
MgCl <sub>2</sub> 50 mM	0,75 µl
3' Primer 10 µM	1,0 µl
5' Primer 10 µM	1,0 µl
nuclases freies Wasser	7,75 µl
<b>Gesamt</b>	<b>25 µl</b>

**Tabelle 9** Protokoll Real Time PCR

<b>Zyklus</b>	<b>Schritt</b>	<b>Temperatur °C</b>	<b>Zeit</b>
1 (1x)	1	95	03:00
2 (45x)	1	94	00:10
	2	57	00:30
	3	72	00:30
3 (1x)	1	72	01:00
4 (1x)	1	95	01:00
5 (1x)	1	54	01:00
6 (80x)	1	54	00:10

### **3.5 Statistik**

Die Bestimmung von Proteingehalt, Enzymaktivitäten, Wasserpotentialen und Elektrolytleitfähigkeiten erfolgte an mindestens drei Individuen pro Versuchsvariante und in Dreifachbestimmung. Die Chlorophyllfluoreszenz wurde an 3 bis 6 Pflanzen gemessen. Die Biomassebestimmung erfolgte an 3-7 Individuen. Die Blattanzahl von Arabidopsis wurde dreimal bei je 15 Pflanzen ermittelt. Die Wurzelwachstumsversuche wurden zweimal mit je 25 Pflanzen wiederholt. Die C/N-Analyse und die Bestimmung der Kohlenhydrate wurde in drei Parallelen pro Kreuzungsumgebung und Kreuzungsjahr untersucht. Die Lipidbestimmung in den Arabidopsissamen wurde in zwei Mischproben pro Kreuzungsjahr und –umgebung dreifach bestimmt.

Die Daten wurden jeweils als Mittelwerte und Standardabweichungen angegeben. Zur Ermittlung signifikanter Unterschiede wurde eine einfache Varianzanalyse (ANOVA), gefolgt von einem „Multiple Range Test“ mit dem least significant difference Test durchgeführt (Statgraphics Plus Version 3, Manugistics, Rockville, USA). Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 0.05 wurden die Unterschiede als signifikant gewertet.

Um deutliche Unterschiede der Proteinmuster der 2D-Elektrophorese zu erkennen, wurden die Proben mehrfach zweidimensional aufgetrennt. So wurden je drei Proteinproben von trockengestressten Fichten und den Kontrollen mindest dreimal zweidimensional aufgetrennt. Ebenso wurden je vier Nadelproben der Kontrollen aus warmer (15046) und kalter (15044) Kreuzungsumgebung 5-fach aufgetrennt. Aufgereinigte Proteinproben von Arabidopsisblättern aus warmer und kalter Kreuzungsumgebung wurden ebenfalls mehrfach aufgetrennt, um signifikante Unterschiede herauszufinden.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Einfluss von Stress auf Fichtensämlinge aus verschiedenen Kreuzungsumgebungen

Die verschiedenen Experimente wurden mit Fichten durchgeführt, deren Eltern zum gleichen Zeitpunkt im Frühjahr einmal im Gewächshaus und einmal im Freiland der Samenplantage gekreuzt wurden. Die Nachkommen dieser Kreuzungen werden als Vollgeschwister bezeichnet. Mit diesen Vollgeschwisterpaaren 15887/15890, 15869/15872 und 15044/15046 wurden zuvor Froststressexperimente mit Testtemperaturen von -11 °C bis -15 °C durchgeführt (Johnson 1989). Dabei wurde die Bräunungsstufe der Nadeln anhand einer Skala von 0 (keine Schäden) bis 11 (alle Nadel braun) bestimmt. Diese Schädigung ist für die oben aufgezählten Vollgeschwister in Tabelle 1 in 2.1 aufgeführt. Dabei wurde im Trend beobachtet, dass die Nachkommen aus der Gewächshauskreuzung frostempfindlicher waren als ihre Vollgeschwister aus der Freilandkreuzung. In den Trockenstressexperimenten sollte geklärt werden, ob die Nachkommen aus den unterschiedlichen Kreuzungsumgebungen auch verschieden auf Trockenheit reagieren.

#### 4.1.1 Trockenstressexperiment 1

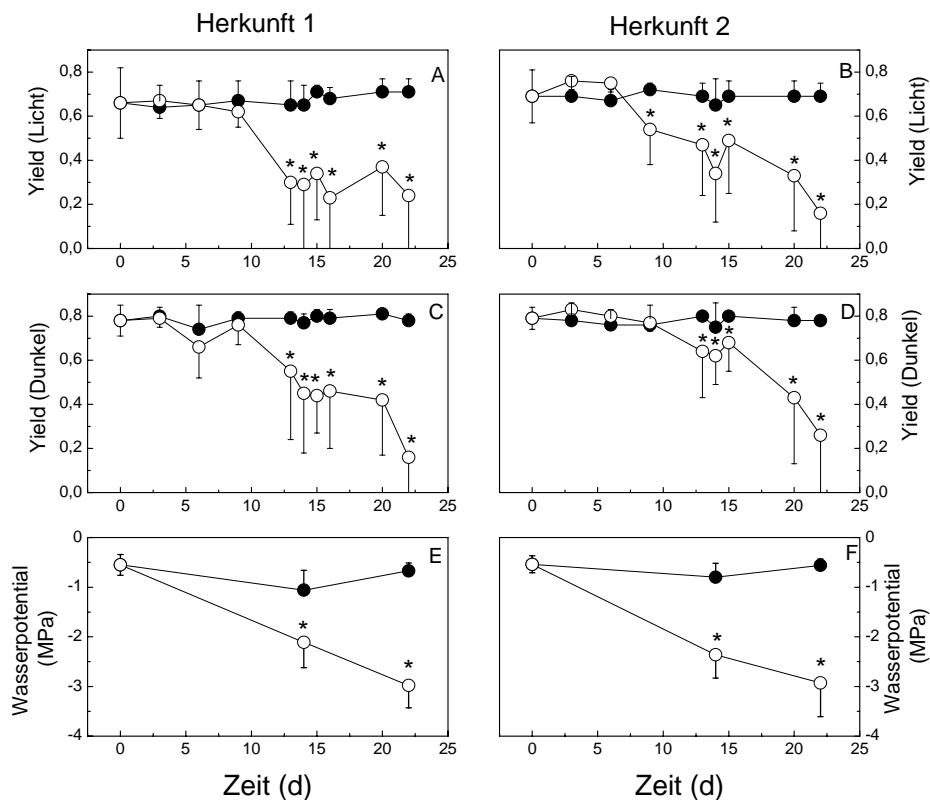
Im Trockenstress 1 wurden die Vollgeschwisterpaare 15887/15890 und 15869/15872 verwendet. Der Trockenstress wurde wie in 3.1.1 angegeben durch Nichtgießen induziert. Chlorophyllfluoreszenz wurde alle drei bis vier Tage in licht- und dunkeladaptierten Pflanzen gemessen. Das Wasserpotential wurde zu den jeweiligen Erntezeitpunkten an drei Parallelen pro Stress und Kontrolle wie, unter 3.2.2 beschrieben, bestimmt. Drei Proben pro Vollgeschwister und Ansatz wurden geerntet. An diesen Proben wurde Frisch- und Trockenmasse gemessen und, wie unter 3.2.4 angegeben, der relative Wasserhaushalt berechnet.

Die Ergebnisse aus den Untersuchungen der physiologischen Parameter ergaben keine signifikanten Unterschiede zwischen den Vollgeschwistern aus den verschiedenen temperierten Kreuzungsumgebungen. Deshalb wurden die beiden Vollgeschwister jeweils zu einer Herkunft zusammengefasst. Aus den Geschwistern 15869/15



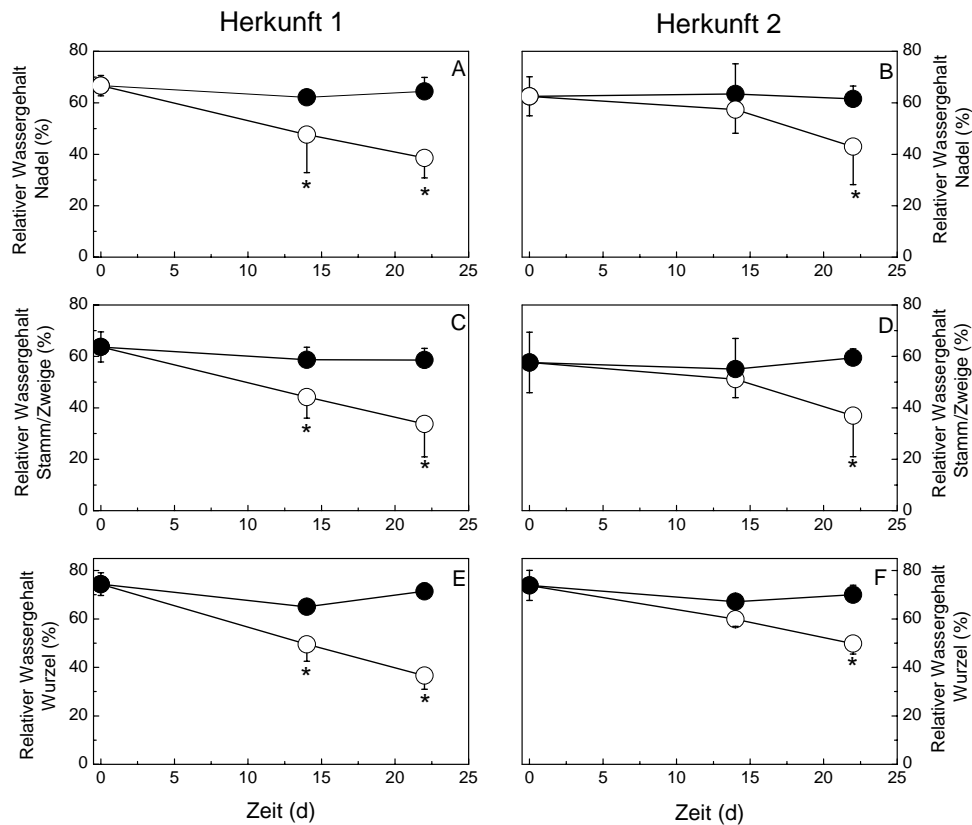
872 wurde die Herkunft 1 und aus den Geschwistern 15887/15890 wurden die Herkunft 2 gebildet. Zwischen den beiden Herkünften existierte ein Unterschied in der Reaktion auf Froststress. Hier reagierte die Herkunft 1 insgesamt empfindlicher (7,3-8,6) als die Herkunft 2 (5,3-5,8).

Um den Einfluss von Trockenstress auf die Photosynthese zu bestimmen, wurde Chlorophyllfluoreszenz an licht- und dunkeladaptierten Fichtennadeln gemessen. Nach 9 Tagen ohne Wasserzufuhr wurde in Herkunft 2 eine signifikante Abnahme ( $P < 0,05$ ) der Chlorophyllfluoreszenz in den lichtadaptierten Nadeln im Vergleich zur Kontrolle beobachtet (Abbildung 7 A, B). Nach 13 Tagen Trockenstress sank die Chlorophyllfluoreszenz im Licht bei den gestressten Pflanzen von Herkunft 1 signifikant und erreichte Werte, die unter denen der Herkunft 2 lagen. Bei den dunkeladaptierten Fichten war ebenfalls eine signifikante Abnahme ( $P < 0,05$ ) der Chlorophyllfluoreszenz nach 14 Tagen Trockenstress in beiden Herkünften zu beobachten (Abbildung 7 C, D). Diese Abnahme war in Herkunft 1 deutlich größer im Vergleich zur Herkunft 2 und betrug rund 40 %. Die Fluoreszenzreduktion in Herkunft 2 betrug etwa 20 %. Zum gleichen Zeitpunkt herrschte in beiden Herkünften ein Wasserpotential in den Stämmen von ungefähr  $-2,2$  MPa (Abbildung 7 E, F). Nach einer weiteren Woche Trockenstress wurden Wasserpotentiale von etwa  $-3$  MPa erreicht, bei dem die Chlorophyllfluoreszenz im Dunkeln in beiden Herkünften um mehr als 70 % reduziert war (Abbildung 7 C, D).



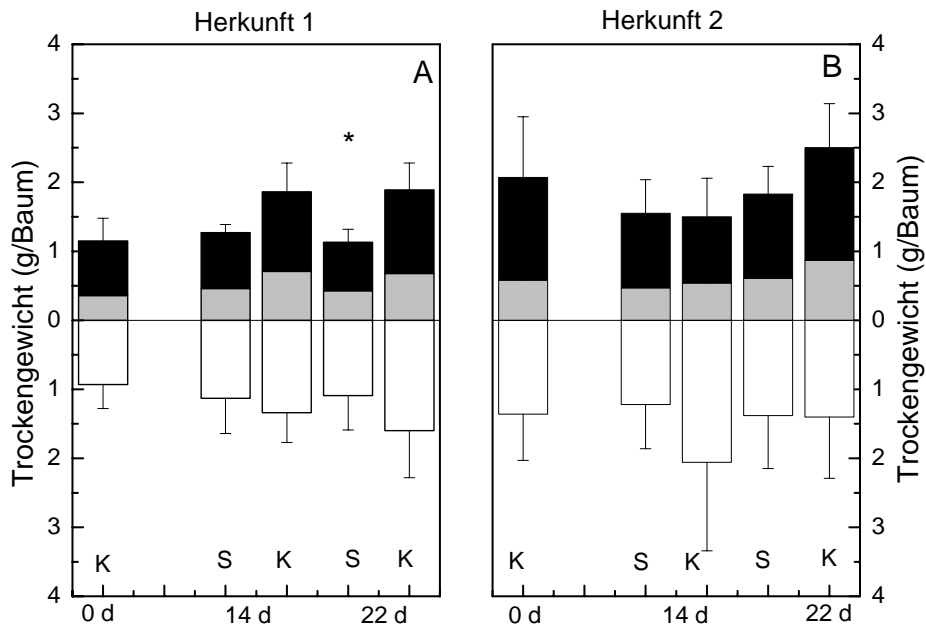
**Abbildung 7 (vorhergehende Seite)** Chlorophyllfluoreszenz von licht- (A, B) und dunkeladaptierten Fichten (D, C) sowie Wasserpotential (E, F) während des Trockenstresses in den Herkünften 1 (links) und 2 (rechts). Offene Kreise symbolisieren gestresste Pflanzen, geschlossene die Kontrollen. Jeder Punkt gibt den Mittelwert aus  $n = 10 \pm$  Standardabweichung bei der Chlorophyllfluoreszenz und  $n = 6 \pm$  Standardabweichung beim Wasserpotential.

Des weiteren wurde der relative Wassergehalt in Nadeln, Stamm bzw. Zweigen und Wurzeln nach Gleichung 4 bestimmt. Die Ergebnisse zeigten eine signifikante Abnahme in allen Pflanzenteilen ( $P < 0,05$ ) in Herkunft 1 nach 14 Tagen Trockenstress (Abbildung 8 A, C, E). In Herkunft 2 sank der relative Wassergehalt signifikant unter den der Kontrolle erst nach drei Wochen Trockenstress (Abbildung 8 B, D, F). Nach drei Wochen Trockenstress waren die Verluste an Wasser in Nadeln und Stamm in beiden Herkünften annähernd gleich. Nur in den Wurzeln betrug er in der Herkunft 1 schon 50 %, während er in der Herkunft 2 etwa bei 30 % lag.



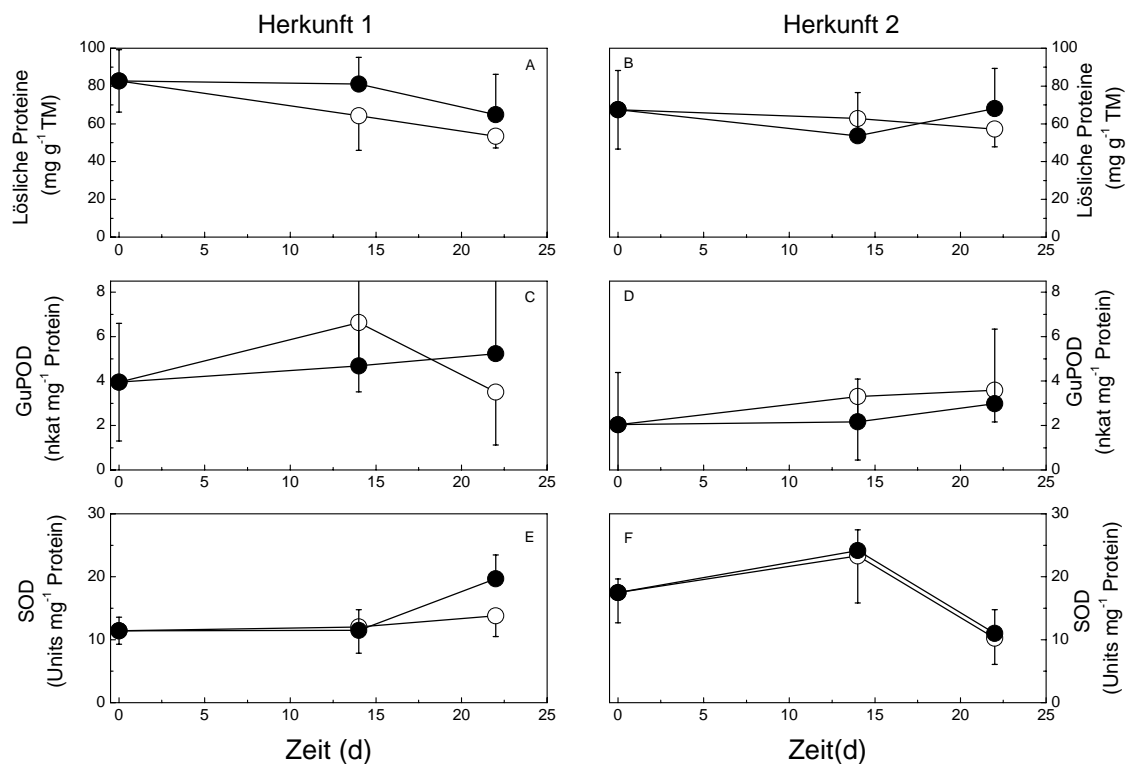
**Abbildung 8** Relativer Wassergehalt in Nadeln, Spross und Wurzeln in Herkunft 1 (links) und Herkunft 2 (rechts). Offene Kreise kennzeichnen die gestressten Pflanzen, geschlossene die Kontrollen. Jeder Punkt steht für einen Mittelwert aus  $n = 6$  mit Standardabweichung. Die Sterne markieren signifikante Unterschiede.

Abbildung 9 zeigt, dass die gesamte Trockenmasse in der Herkunft 1 nach 3 Wochen Trockenstress signifikant ( $P < 0,05$ ) um 35 % vermindert war. Im einzelnen betrug die Reduktion für die oberirdische Biomasse (Spross und Nadeln zusammen) 40 %, für die Wurzeln 30 % (Abbildung 9 A). In der Herkunft 2 war die Gesamttrockenmasse zwischen Stress und Kontrolle auch nach drei Wochen nicht signifikant verschieden. Die Trockenmasse von Spross und Nadeln hatte in den gestressten Pflanzen um 27 % abgenommen, war in den Wurzeln gegenüber der Kontrolle aber gleich geblieben (Abbildung 9 B).



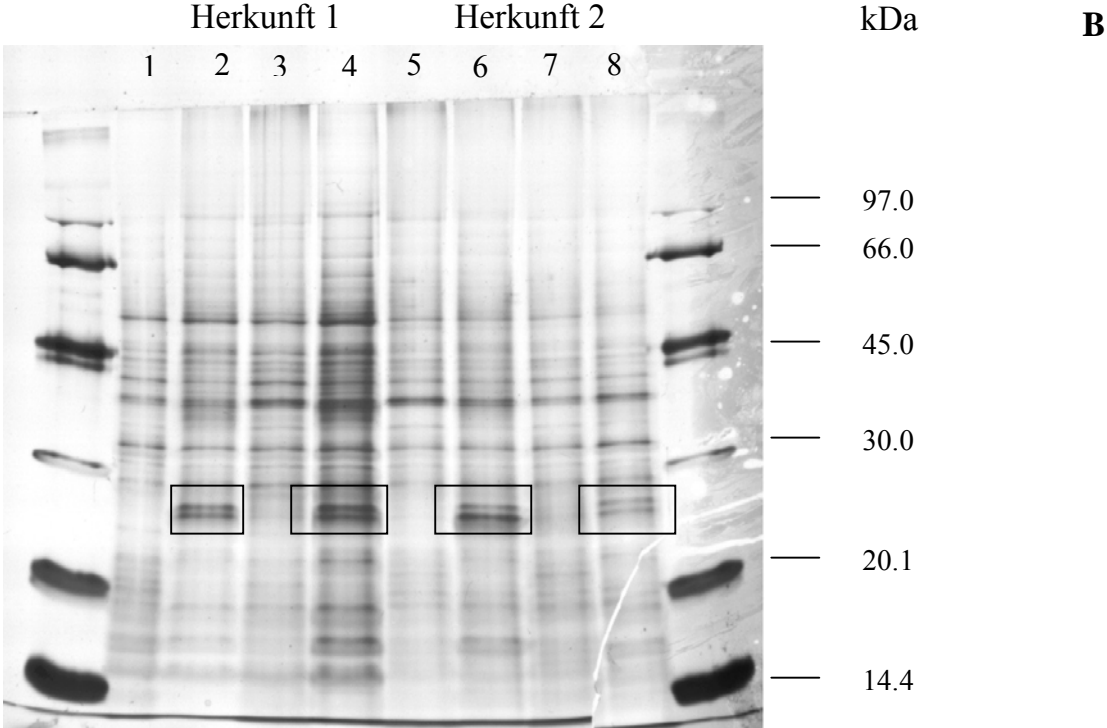
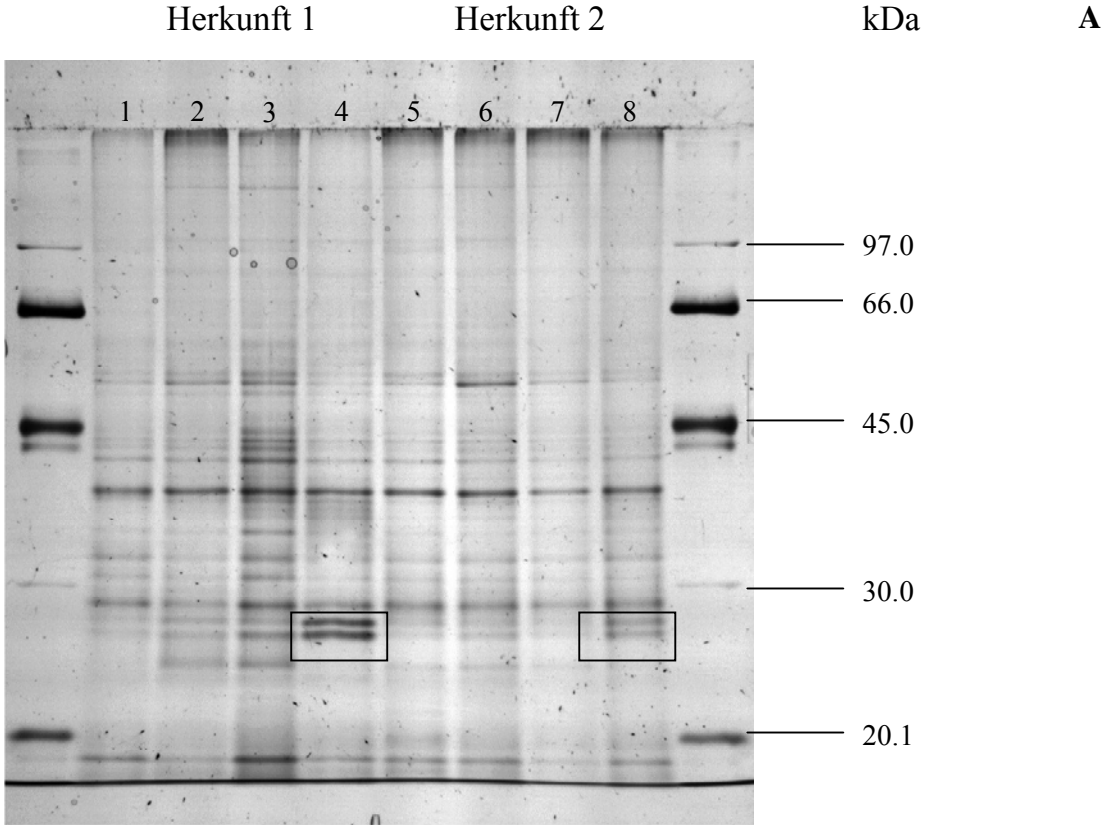
**Abbildung 9** Trockengewichte von Nadeln (schwarz), Stamm (grau) und Wurzeln (weiß) von gestressten Fichten (S) und Kontrollen (K) von Herkunft 1 und Herkunft 2. Jede Säule markiert den Mittelwert aus  $n = 6$  mit Standardabweichung. Der Stern markieren signifikante Unterschiede in der Gesamtbiomasse.

Um die Stressreaktion der Fichten auf Trockenheit näher zu charakterisieren, wurden in Nadelextrakten die Aktivitäten von Guajakolperoxidase (GuPOD) und Superoxiddismutase (SOD) bzw. der Proteingehalt (siehe 3.3.2 und 3.3.3) bestimmt. Die biochemischen Analysen ergaben für beide Herkünfte keine signifikanten Veränderungen dieser Parameter in bezug auf den Trockenstress (Abbildung 4). Weder veränderte sich der Gesamtgehalt an löslichen Proteinen (Abbildung 10 A, B), noch die Aktivitäten von GuPOD und SOD (Abbildung 10 C-F). Allerdings war der Gesamtgehalt an löslichen Proteinen in Herkunft 1 ( $82,7 \pm 16,5$  mg/g TM) signifikant ( $P < 0,05$ ) höher als in Herkunft 2 ( $67,5 \pm 20,8$  mg/gTM). Zudem war in Herkunft 1 die GuPOD-Aktivität ca. 2 mal höher als in Herkunft 2 ( $4,0 \pm 2,7$  nkat/mg Protein versus  $2,0 \pm 2,4$  nkat/mg Prot). Im Gegensatz dazu war die Aktivität der SOD in Herkunft 2 ( $17,5 \pm 4,8$  Units/g Protein) signifikant ( $P < 0,05$ ) höher als in Herkunft 1 ( $11,4 \pm 2,15$  Units/g Protein).



**Abbildung 10** Gehalt löslicher Proteine (A, B), Aktivitäten von GuPOD (C, D) und SOD (E, F) in trocken gestressten Fichten von Familie 1 und Familie 2. Offenen Kreise symbolisieren die gestressten Pflanzen, geschlossene die Kontrollen. Jeder Punkt markiert den Mittelwert aus  $n = 6$  mit Standardabweichung.

Obwohl keine Veränderungen im Gesamtproteingehalt durch den Trockenstress nachgewiesen werden konnten, wurden Veränderungen im Proteinbandenmuster (siehe 3.3.4) zwischen gestressten Fichten und Kontrollen beobachtet (Abbildung 11 A, B). Für die elektrophoretische Trennung wurden die Proben der einzelnen Vollgeschwister (15887 und 15890 bzw. 15869 und 15872) getrennt aufgetragen. Dabei war zu erkennen, dass nach 14 Tagen Trockenheit in beiden Herkünften in den gestressten Pflanzen (Reihe 4 und 8) zwei Banden mit einem Molekulargewicht von 25,5 kDa und 24,3 kDa stärker wurden (Abbildung 11 A). Beide Proben entsprachen den Samenchargen 15890 und 15872 und stammten von Elternpaaren, die im Freiland gekreuzt wurden. Nach 22 Tagen Trockenstress wurde in allen Vollgeschwistern diese Doppelbande (Reihen 2, 4, 6, 8) im Vergleich zur Kontrolle stärker (Abbildung 11 B). Weitere Unterschiede innerhalb der Proteinbandenmuster zwischen Stress und Kontrolle wurden nicht gefunden, auch nicht zwischen beiden Herkünften.



**Abbildung 11 (vorherige Seite)** Muster löslicher Nadelproteine von Herkunft 1 (Reihen 1-4) und Herkunft 2 (Reihen 5-8) nach elektrophoretischer Trennung. Die Reihen 1, 3, 5 und 7 zeigen Proben von Kontrollen, die Reihen 2, 4, 6 und 8 Proben von gestressten Pflanzen. Bild A zeigt Proteinmuster nach 14 Tagen Stress, Bild B nach drei Wochen Stress. Kästen markieren die stärker aufgetretenen Banden.

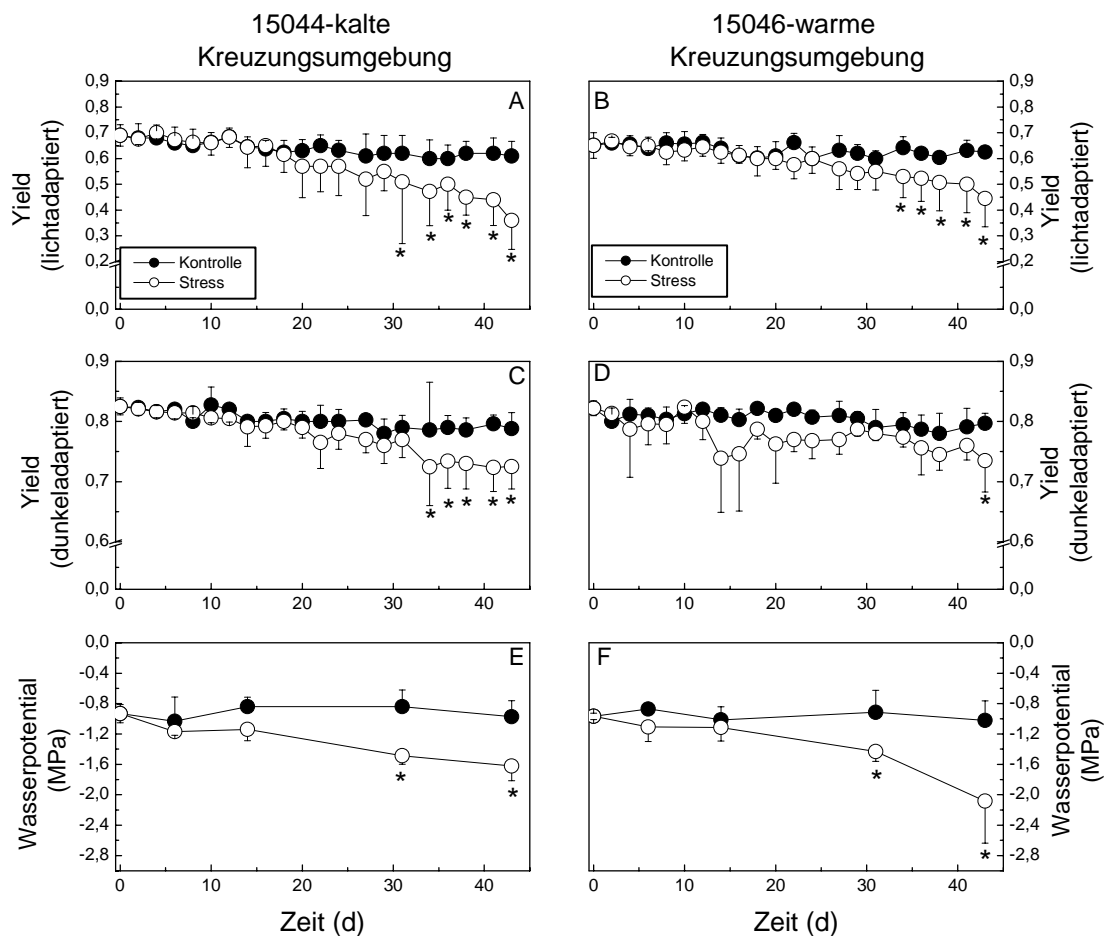
#### 4.1.2 Trockenstressexperiment 2

Das 2. Trockenstressexperiment wurde mit den Vollgeschwistern 15044/15046 durchgeführt. Sie wiesen innerhalb der untersuchten Vollgeschwisterpaare den größten Unterschied bei Nadelschäden nach Froststress auf (Tabelle 1). Dabei reagierten die Nachkommen aus der Gewächshauskreuzung (15046) empfindlicher auf den Froststress (5,5) als die Vollgeschwister von draußen (3,8).

Bei Versuchsbeginn hatten die Pflanzen eine Wuchshöhe von 20 cm bis 30 cm. Der Trockenstress wurde durch Nichtgießen induziert und entwickelte sich aufgrund der größeren Töpfe deutlich langsamer als im ersten Stressexperiment.

Um die Auswirkungen von Trockenstress im zeitlichen Verlauf zu charakterisieren, wurde die Chlorophyllfluoreszenz licht- und dunkeladaptierter Pflanzen alle zwei bis drei Tage gemessen. Der Verlauf der Chlorophyllfluoreszenz sowohl im Licht als auch im Dunkeln zeigte zwischen den Setzlingen beider Kreuzungsumgebungen Unterschiede (Abbildung 12 A, B, C, D). In den lichtadaptierten Nadeln der Nachkommen aus der kalten Kreuzungsumgebung war die Chlorophyllfluoreszenz nach 31 Tagen signifikant ( $P < 0,05$ ) von der Kontrolle verschieden, bei den Nachkommen aus der warmen Kreuzungsumgebung erst drei Tage später (Abbildung 12 A, B). Ähnlich verhielt es sich mit der Chlorophyllfluoreszenz von dunkeladaptierten Pflanzen (Abbildung 12 C, D). In den Fichtennachkommen aus der kalten Kreuzungsumgebung war die Chlorophyllfluoreszenz nach 4 Wochen signifikant ( $P < 0,05$ ) geringer als die von den Kontrollen, in den Nachkommen aus der warmen Kreuzungsumgebung erst nach sechs Wochen, am Ende des Versuches. Untersuchte man nun anhand der Chlorophyllfluoreszenz, ob eine der Samenchargen stärker gestresst war als die andere, sah man, dass im Dunkeln der Wert sowohl in 15044 als auch in 15046 um 10 % abgenommen hatte. Im Licht war die Chlorophyllfluoreszenz nach 6 Wochen in der Samencharge 15044 um 40 %, in der Samencharge 15046 um 30 % reduziert. Dieser Unterschied war nicht signifikant.

Das Wasserpotential nahm mit zunehmendem Trockenstress signifikant ( $P < 0,05$ ) ab, war aber zu keiner Zeit verschieden innerhalb der beiden Vollgeschwisterfamilien (Abbildung 12 E, F).

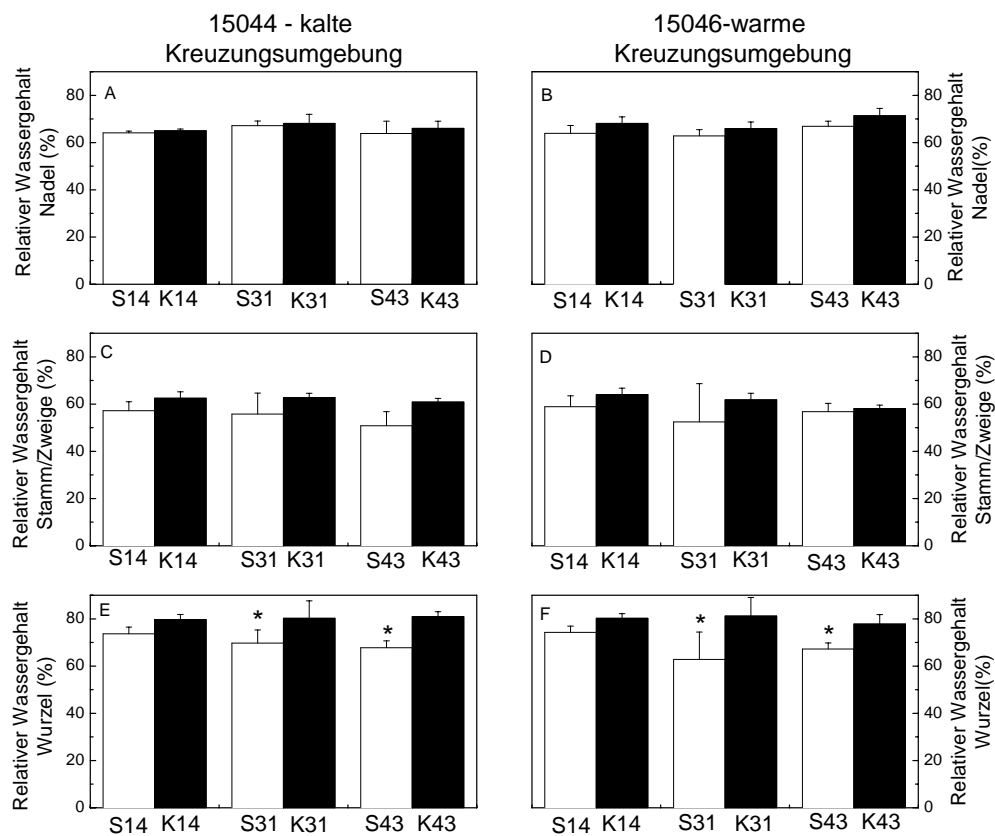


**Abbildung 12** Chlorophyllfluoreszenz im Licht (A, B), im Dunkeln (C, D) und das Wasserpotential von Vollgeschwistern aus verschiedenen Kreuzungsumgebungen während des Trockenstresses. Offene Kreise symbolisieren die gestressten Pflanzen, geschlossene die Kontrollen. Jeder Punkt markiert den Mittelwert aus  $n=6$  mit Standardabweichung.

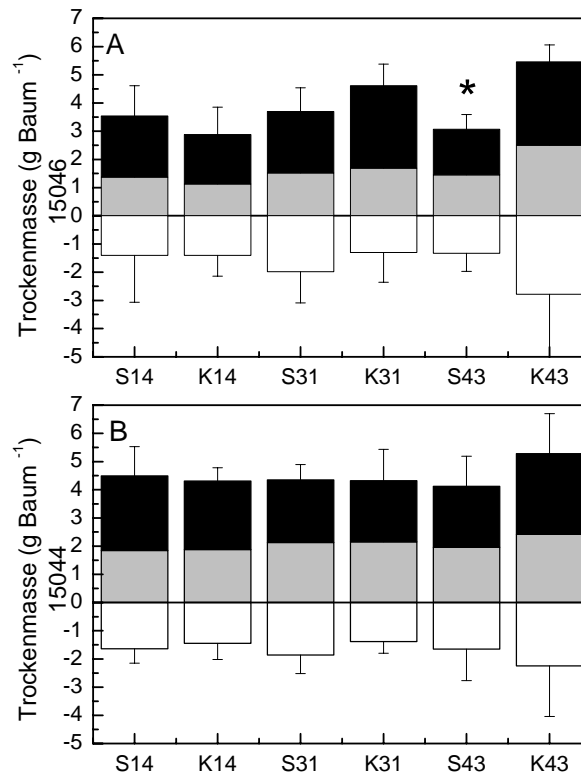
Der Wassergehalt war nach 31 Tagen und 43 Tagen in den Wurzeln von gestressten Pflanzen signifikant ( $P < 0,05$ ) geringer als in den Kontrollen (Abbildung 13 E, F). Die Abnahme des Wassergehaltes war in beiden Geschwistern ungefähr gleich und betrug 15 %. Der Trockenstress zeigte während des ganzen Versuches keinen signifikanten Einfluss auf den Wassergehalt des Stammes oder der Nadeln (Abbildung 13 A, B, C, D).

Die Gesamttrockenmasse in den Nachkommen aus der warmen Kreuzungsumgebung (15046) war nach 6 Wochen Trockenstress signifikant ( $P < 0,05$ ) geringer als die der Kontrolle (Abbildung 14 A). Die Differenz zwischen Stress und Kontrolle betrug für Nadeln und Stamm rund 60 %, bei den Wurzeln 50 %. In den Vollgeschwistern aus der kalten Kreuzungsumgebung (15044) hatte sich trotz gleicher Stressbedingungen die Trockenmasse im Vergleich zur Kontrolle nicht signifikant verändert (Abbildung 14 B).



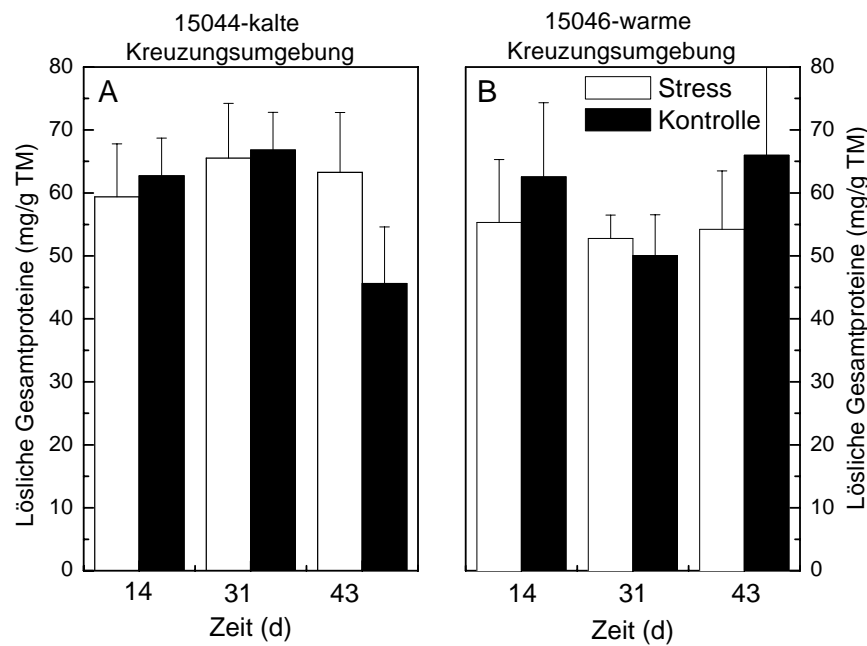


**Abbildung 13** Relativer Wassergehalt in Nadeln (A, B), Stamm (C, D) und Wurzeln (E, F) in gestressten Fichten -S- (weiße Säulen) und Kontrollen -K- (schwarze Säulen) von Nachkommen aus warmer und kalter Kreuzungsumgebung nach 14, 31 und 43 Tagen Trockenheit. Jede Säule markiert den Mittelwert aus  $n = 6$  mit Standardabweichung. Signifikante Unterschiede sind mit einem Stern gekennzeichnet.



**Abbildung 14** Trockenmasse von Nadeln (schwarz), Stamm (grau) und Wurzeln (weiß) von gestressten Pflanzen (S) und Kontrollen (K) nach 14, 31 und 43 Tagen. A zeigt Ergebnisse der Fichten aus der warmen Kreuzungsumgebung, B zeigt die Ergebnisse der Fichten aus der kalten Kreuzungsumgebung. Jede Säule gibt den Mittelwert für  $n = 6 \pm$  Standardabweichung. Der Stern markiert signifikante Unterschiede ( $P < 0,05$ ).

Der Gesamtgehalt an löslichen Proteinen veränderte sich in beiden Vollgeschwistern im Zuge des Trockenstresses nicht signifikant (Abbildung 15 A, B).



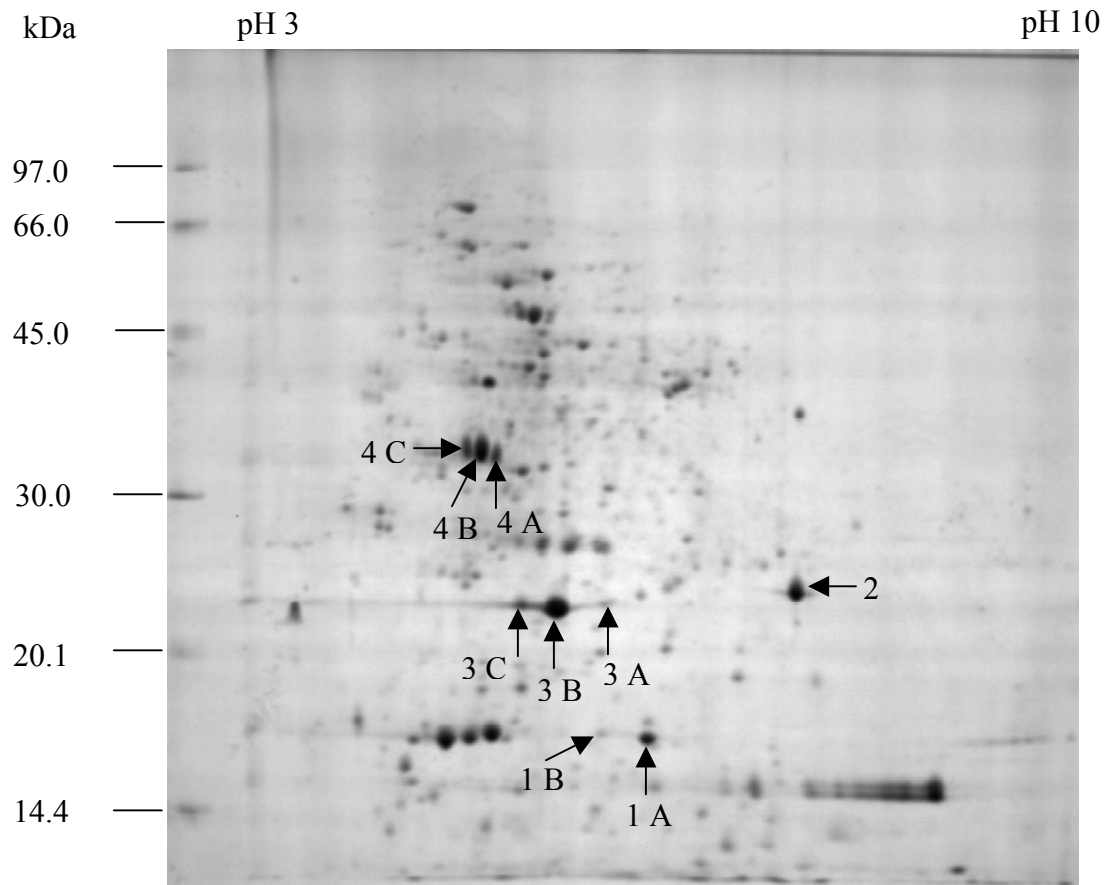
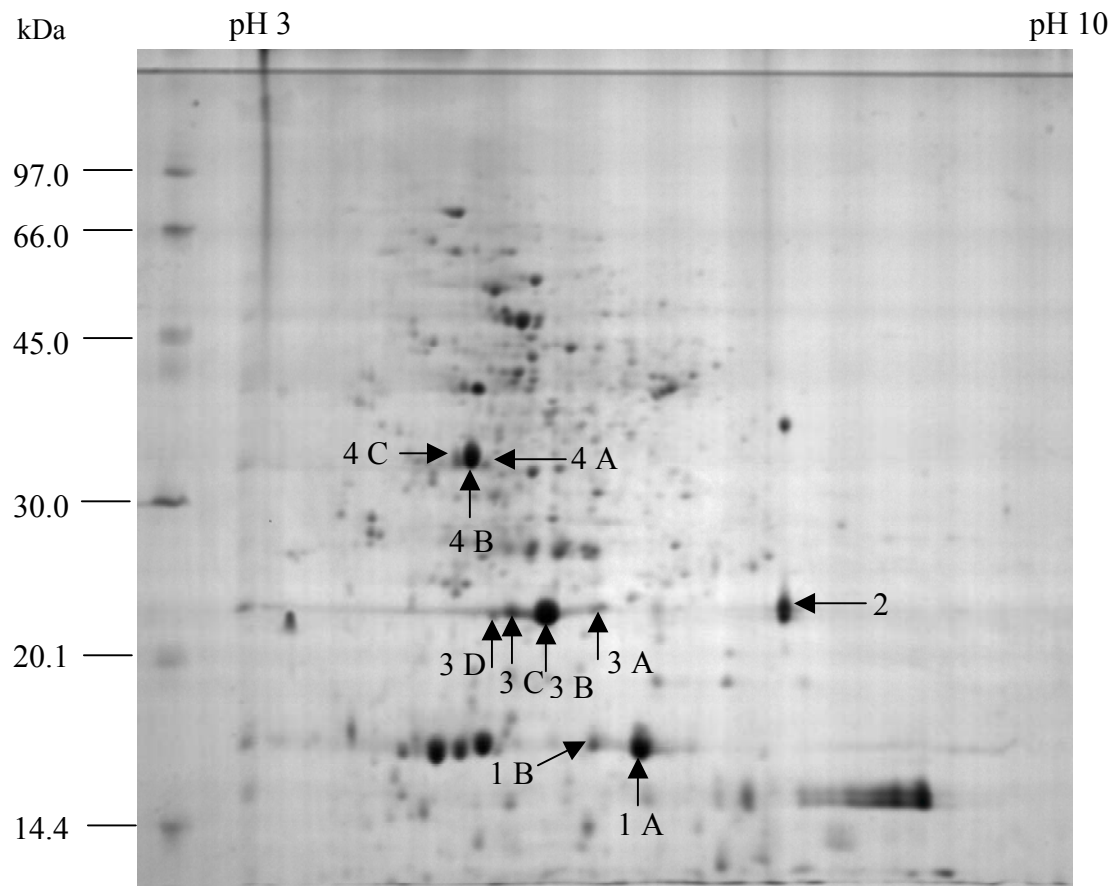
**Abbildung 15** Proteingehalt in trockengestressten Fichten (weis) und deren Kontrollen (schwarz) nach 14, 31 und 43 Tagen Trockenheit. Jede Säule markiert den Mittelwert aus  $n = 6$  mit Standardabweichung.

Um mögliche Veränderungen des Proteinmusters näher charakterisieren zu können, wurden die Proben aus dem Trockenstressversuch 2 mittels zweidimensionaler Elektrophorese getrennt. Der Schwerpunkt lag hier auf Proben der Samencharge 15044 nach 14 Tagen Trockenstress und den dazugehörigen Kontrollen, da parallel in diesen Proben Veränderungen in der Genexpression untersucht wurden (Dr. B. Vornam, Institut für Forstgenetik). Die Fichten der Samencharge 15044 hatten signifikante Unterschiede in der Transkriptmenge von einer ATP-synthase, eines Antifreeze-like Proteins, eines Chlorophyll a/b bindenden Proteins des Lichtsammelkomplexes I und von Polyubiquitin in den Nadeln gezeigt, obwohl zu diesem Zeitpunkt keiner der ökophysiologischen Parameter Veränderungen zeigte. Es galt zu untersuchen, ob auch schon Veränderungen auf der Proteinebene stattgefunden hatten. Die 2-D-Elektrophorese wurde wie in 3.3.5 beschrieben mit je drei individuellen Nadelproben von gestressten Fichten und Kontrollen durchgeführt. Die Auftrennung in der ersten Dimension fand in dem pH-Bereich 3-10 statt. In der zweiten Dimension wurden die Proteine nach Molekulargewicht aufgetrennt. Abbildungen 16 zeigt das Proteinspektrum einer gestressten Pflanze und Abbildung 17 das einer Kontrolle. Bei dem Vergleich der mit Coomassie gefärbten Gele kristallisierten sich einige wenige Spots heraus, die signifikant zwischen Kontrollen und gestressten Pflanzen verschieden waren. Diese Spots sind in Tabelle 10 aufgelistet. Innerhalb dieser

Proteingruppe wurden die Spots 4 A-C mit einem Molekulargewicht (MW) von 35-37 kDa und einem isoelektrischen Punkt (IP) um pH 5 als OEE 1-Proteine (oxygen evolving enhancer protein 1) identifiziert. Spot Nummer 2, der ein errechnetes MW zwischen 22,7 und 24,4 kDa hatte und einen IP von rund pH 7,7, wurde als OEE 2-Protein (oxygen evolving enhancer protein 2) identifiziert. Beide Proteine stehen in Verbindung mit dem sauerstoffentwickelnden Komplex (oxygen evolving complex) des Photosystems II. Innerhalb dieser Gruppe wurden Spot 2 und Spot 4B im Vergleich zur Kontrolle stärker, während die Spots 4 A und 4 C verschwanden. Die Peptidsequenzen der Spotgruppe 3 A-D wurden als Fragmente der großen Untereinheit von Ribulose-1,5-bisphosphat Carboxylase/Oxygenase (Rubisco LS) identifiziert. Die Spots hatten alle ein MW von ungefähr 23-24 kDa mit verschiedenen IP's von ca. pH 6,2 bis pH 5,2. Innerhalb dieser Gruppe war Spot 3 D im Vergleich zur Kontrolle neu und Spot 3 C stärker ausgeprägt, während sich die Spots 3 B und 3 A nicht verändert hatten. Spots 1 A und B konnten nicht über Proteindatenbanken identifiziert werden. Die Suche in der EST-Datenbank ergab einen Treffer mit einer Wahrscheinlichkeit zwischen 80 und 100. Die Peptidsequenz schien einem cDNA Klon von *Picea engelmannii* and *Picea sitchensis* (Ralph et al. 2005, unveröffentlicht) ähnlich zu sein. Wenn diese Nucleotidsequenz wiederum in NCBI geblastet wurde, wurde je ein unbekanntes Protein von Reis und Arabidopsis mit einer Treffergenauigkeit von 81 bzw. 76 an den ersten Stellen aufgeführt.

**Abbildung 16 (nachfolgende Seite oben)** 2-D-Gel löslicher Proteine von Fichtennadeln der Samencharge 15044 nach 14 Tagen Trockenstress. Das Gel wurde mit Coomassie gefärbt. Die Auftrennung in der ersten Dimension fand im pH-Bereich 3-10 statt, die zweite Dimension auf 12 % Gelen. Nummerierte Spots wurden mittels LC-MS analysiert.

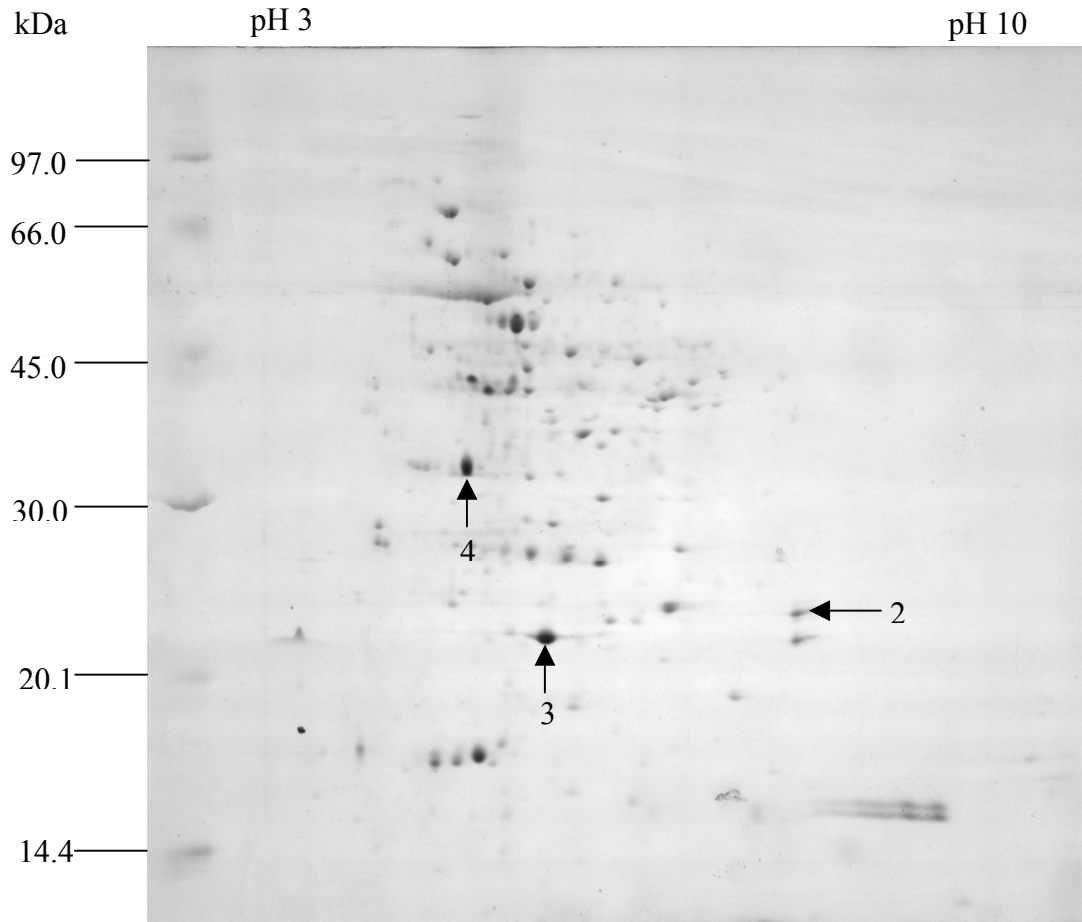
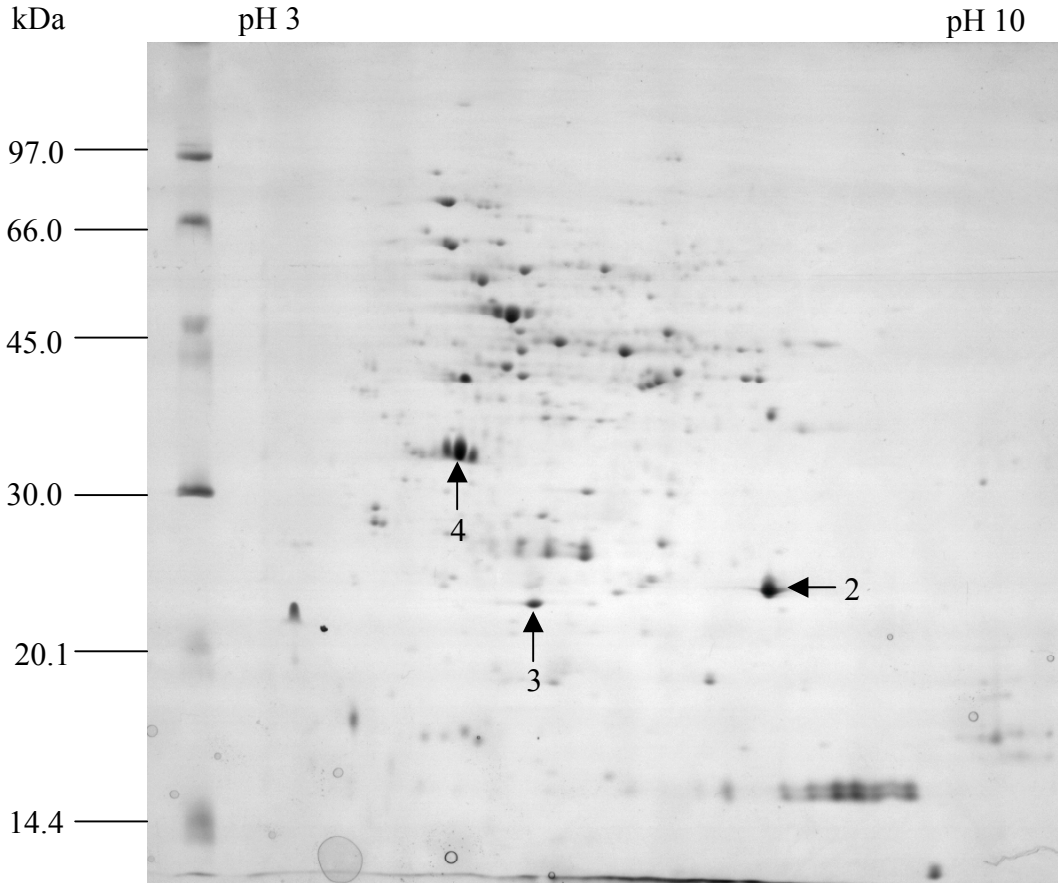
**Abbildung 17 (nachfolgende Seite unten)** 2-D-Gel löslicher Proteine nicht gestresster Fichtennadeln der Samencharge 15044. Das Gel wurde mit Coomassie gefärbt. Die Auftrennung in der ersten Dimension fand im pH-Bereich 3-10 statt, die zweite Dimension auf 12 % Gelen. Nummerierte Spots wurden mittels LC-MS analysiert.



**Tabelle 10** Identifizierte Nadelproteine in der Samencharge 15044, die in den Proben von trockengestressten Fichten signifikant von Kontrollen verschieden waren.

Spot no.	MW (kDa)	pI	Stress	Protein	NCBI accession no.	Sequence (peptide score)	Protein Mascot Score	Database
1A	15,73	6,3 - 6,8	+	unknown protein, mRNA sequence:IS0014.B21.1_F17 IS-B-A-4 Picea engelmannii x Picea sitchensis	gij49015321	SLTFETNQR (44) WDDGTFSR (34) KLEPVGPLDTK (24)	100	EST
1B	16	6,1	+	unknown protein, mRNA sequence:IS0014.B21.1_F17 IS-B-A-4 Picea engelmannii x Picea sitchensis	gij49015322	SLTFETNQR (44) WDDGTFSR (34) KLEPVGPLDTK (24)	82	EST
2	24,4-22,7	7,7	+	Oxygen-evolving enhancer protein 2 (OEE2)	PSBP_PINPS, JSO771	AYGEAANVFGAPK (76) QYYNISVLTR (47)	76 47	MSDB
3A	23-24	6,2	0	Rubisco LS fragment (Vaccinium vitis-idea)	Q71N63_VACVI	VLPHALR (20) LTYYPNYETK (17) TFQGPPHGIQVER (30)	72	MSDB
3B	23-24	5,7	0	Rubisco LS fragment (Encephalartos arenatus and other)	Q8HVG8_ENCARI	AGVKDYR (22) DTDILAAFR (40) LEDLRIPPAYSK (23) TFKGPPHGIQVER (42)	299	MSDB
3C	23-24	5,5	+	Rubisco LS fragment (Adenophorus abientinus and other)	Q8SN43_9FILI	IPPAYSK (15) DTDILAAFR (43) GPPHGIQVER (30) LTYYTPEYKTK (23)	124	MSDB
3D	23-24	5,2	+	Rubisco LS fragment (Digitalis purpurea and other)	Q6Y2Y7	AYGEAANVFGAPK (76) QYYNISVLTR (47)	132	MSDB
4A	35-37	5,3	-	33 kDa polypeptide of oxygen evolving complex (OEC) in PS II	Q8L7F1_ARATH	GDEEELVK (31) VPFLFTVK (38) GGSTGYDNAVALPAGGR (43)	127	MSDB
4B	35-37	5,0	+	oxygen evolving enhancer protein 1 precursor	Q9LRC4_9ROSI	GSSFLLDPK (23) VPFLFTVK (42) GGSTGYDNAVALPAGGR (77) LTYDEIQSKTYLEVK (24)	238	MSDB
4C	35-37	4,9	-	33 kDa polypeptide of oxygen evolving complex (OEC) in PS II	Q8L7F1_ARATH	GDEEELVK (31) VPFLFTVK (38) GGSTGYDNAVALPAGGR (43)	120	MSDB

Je zwei Proben gestresster Pflanzen und deren Kontrollen aus der Samencharge 15046 wurden ebenfalls zweidimensional aufgetrennt (Abbildungen 18 und 19). Im Trend können die Ergebnisse aus der Samencharge 15044 auch hier gezeigt werden. Beide Proteine des sauerstoffentwickelnden Apparates OEE 1 (Spot 4) und OEE 2 (Spot 1) sind in den gestressten Pflanzen stärker als in den Kontrollen. Über Veränderungen der großen Untereinheit von Rubisco (Spot 3) konnten keine genaueren Aussagen gemacht werden.

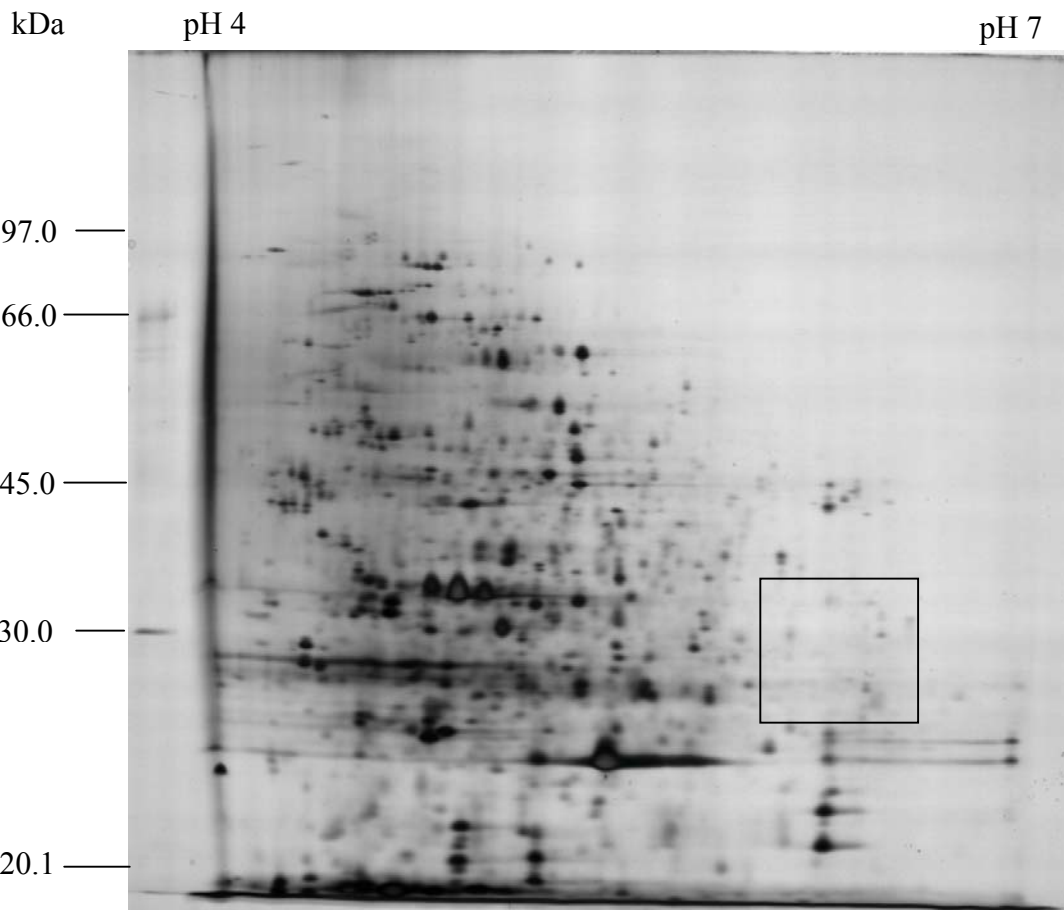
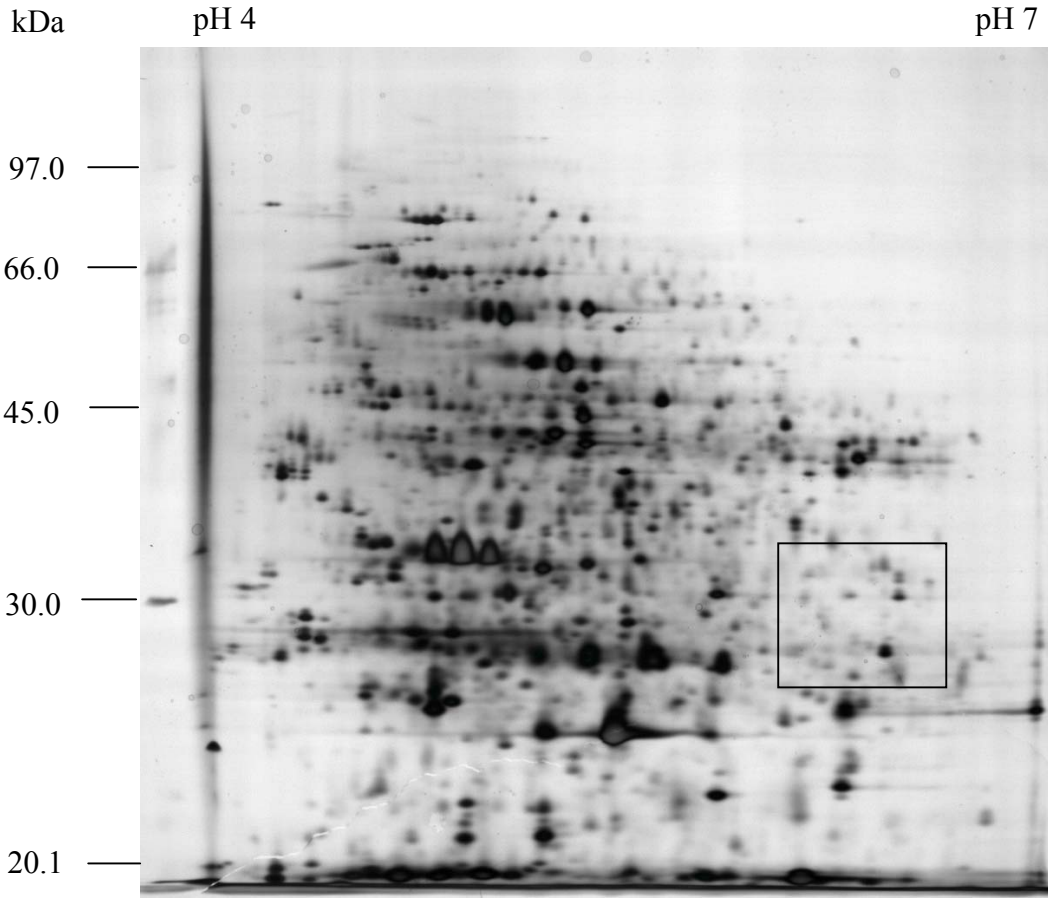




**Abbildung 18 (vorhergehende Seite oben)** 2-D-Elektrophorese von löslichen Proteinen Fichtennadeln der Samencharge 15046 nach 14 Tagen Trockenstress. Die Auftrennung nach isoelektrischem Punkt fand im pH-Bereich 3-10 statt. Die Auftrennung nach dem Molekulargewicht auf 12 %igen Gelen. Gefärbt wurde mit Coomassie. Die Nummerierung entspricht der aus der Samencharge 15044 (Abbildungen 16 und 17).

**Abbildung 19 (vorhergehende Seite unten)** 2-D-Elektrophorese von löslichen Proteinen der Kontrollen der Samencharge 15046. Die Auftrennung nach isoelektrischem Punkt fand im pH-Bereich 3-10 statt. Die Auftrennung nach dem Molekulargewicht auf 12 %igen Gelen. Gefärbt wurde mit Coomassie. Die Nummerierung entspricht der aus der Samencharge 15044.

Es wurden mittels 2-D-Elektrophorese nicht nur trockengestresste Pflanzen und die dazugehörigen Kontrollen miteinander verglichen, sondern auch die Kontrollen untereinander. Eine andere Arbeitsgruppe (AG Prof. Müller-Starck, TU München) hatte die Samenchargen 15044 und 15046 aus den verschiedenen Kreuzungsumgebungen untersucht und Unterschiede in der DNA-Methylierung gefunden (Baumann 2004). Dabei waren die Nachkommen aus der warmen Kreuzungsumgebung (15046) stärker methyliert als die aus der kalten Kreuzungsumgebung (15044). Es wurde mit Hilfe der zweidimensionalen Elektrophorese geprüft, ob diese Methylierung auf die Zusammensetzung der Proteilmuster eine Auswirkung hatte. Abbildung 21 zeigt das Proteom von Kontrollen aus warmer Kreuzungsumgebung und Abbildung 20 zeigt das Proteom von Kontrollen aus kalter Kreuzungsumgebung. Dabei fiel eine Proteingruppe auf, die in der Samencharge 15044 zu sehen war und in der Charge 15046 nicht. Diese Proteingruppe befand sich in einem Bereich mit einem isoelektrischen Punkt von pH 6,5-7,5 und einem Molekulargewicht von 26,6-29 kDa. Versuche, diese Proteine zu identifizieren schlugen fehl, da diese Spots sich nicht mit Coomassie anfärben ließen.



**Abbildung 20 (vorhergehende Seite oben)** Zweidimensionale Elektrophorese von Nadelproteinen der Nachkommen aus der kalten Kreuzungsumgebung (15044). Die Auftrennung nach dem isoelektrischen Punkt fand im pH-Bereich 4-7 statt, die Auftrennung nach dem Molekulargewicht auf 12%igen Gele. Die Gele wurden silbergefärbt. Das Kästchen markiert die Proteingruppe, die verstärkt auftritt.

**Abbildung 21 (vorhergehende Seite unten)** Zweidimensionale Elektrophorese von Nadelproteinen der Nachkommen aus der warmen Kreuzungsumgebung (15046). Die Auftrennung nach dem isoelektrischen Punkt fand im pH-Bereich 4-7 statt, die Auftrennung nach dem Molekulargewicht auf 12%igen Gelen. Die Gele wurden silbergefärbt.

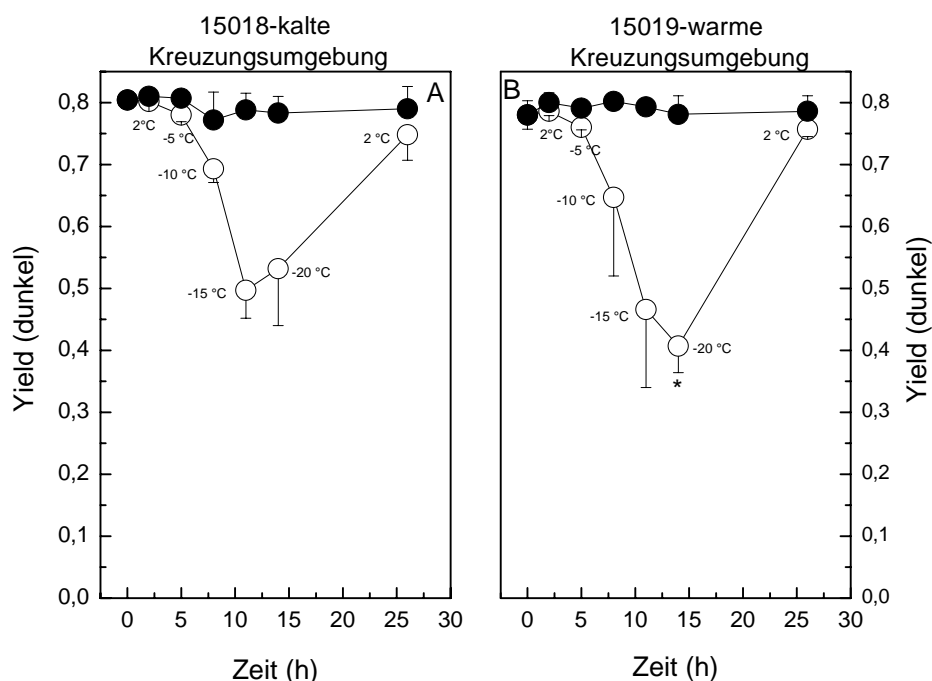
### 4.1.3 Froststressversuche

Um den Einfluss der Kreuzungsumgebung auf das Stressverhalten der Nachkommen zu untersuchen, wurden insgesamt drei Froststressversuche durchgeführt. Für den ersten im Oktober 2003 wurden die Samenchargen 15018 und 15019 benutzt. Für die beiden anderen Versuche im Februar 2004 wurden die Vollgeschwisterpaare 15018/15019 und 15020/15021 verwendet. Vorversuche zur Frosttoleranz seitens der norwegischen Arbeitsgruppe (Prof. Skroppa, Norwegian Forest Research Institute) lagen nicht vor. Die Samencharge 15018 und 15020 stammten aus einer Freilandkreuzung (kalt), während ihre Vollgeschwister 15019 bzw. 15021 aus einer Gewächshauskreuzung (warm) stammten (Tabelle 1). Zwischen diesen verschiedenen Kreuzungsumgebungen waren zuvor von der norwegischen Arbeitsgruppe (Prof. Skroppa, Norwegian Forest Research Institute) Unterschiede im Knospenansatz in der Zeit von Mitte August bis Anfang September beobachtet. Mit Hilfe der Froststressversuche galt es zu prüfen, ob, wie in den anderen Familien, Unterschiede in der Frostresistenz bestünden.

### 4.1.4 Froststressversuch 1

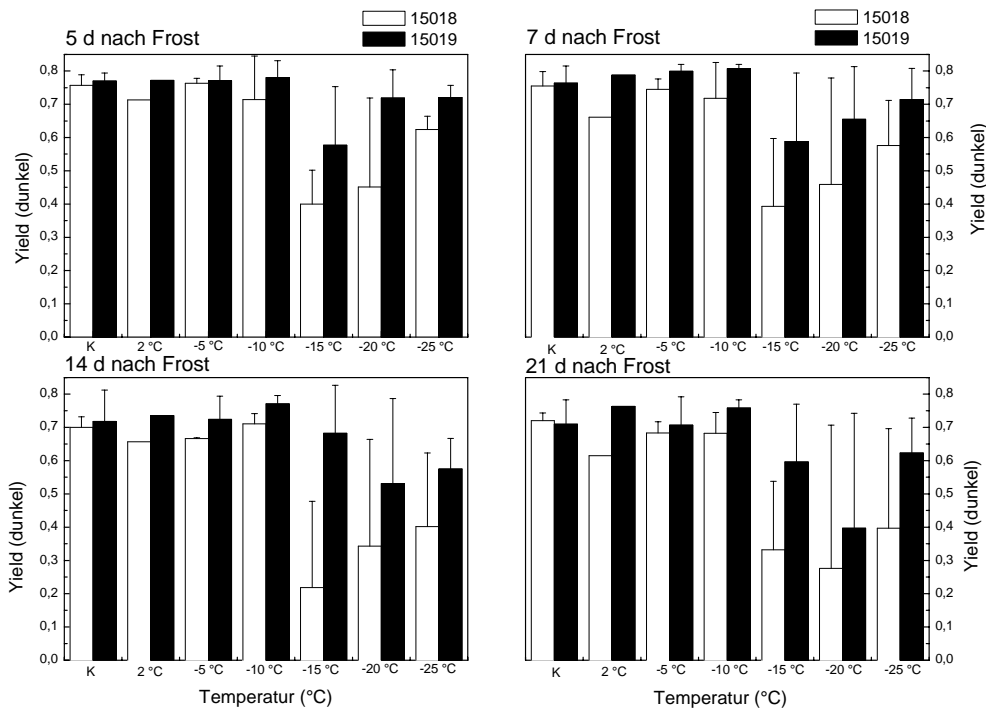
Der Froststressversuch wurde in einer programmierbaren Klimakammer ohne Licht durchgeführt (siehe 3.1.2). Die Fichten wurden Temperaturen von bis zu  $-25\text{ °C}$  ausgesetzt. Auf jeder Temperaturstufe (Ausnahme  $-25\text{ °C}$ ) wurde eine Gruppe von Pflanzen aus der Klimakammer herausgenommen und in das Gewächshaus zurückgestellt. Zur Überprüfung des Kälteeinflusses auf die Photosynthese wurde die Chlorophyllfluoreszenz während des Stresses auf jeder Temperaturstufe gemessen und danach, während der Erholungsphase, in regelmäßigen Abständen für weitere 4 Wochen. Parallel dazu wurden immer ungestresste Pflanzen als Kontrollen gemessen. Während des Froststresses sank die Chlorophyllfluoreszenz mit sinkender Temperatur. Nachdem die

Temperatur in der Klimakammer wieder auf 2 °C erwärmt war, entsprach die Chlorophyllfluoreszenz der gestressten Pflanzen der der Kontrollen. Bei –20 °C war der „Yield“ in den Sämlingen der Charge 15018 ( $0,532 \pm 0,092$ ) gering aber signifikant höher als der „Yield“ in der Samencharge 15019 ( $0,407 \pm 0,043$ ) (Abbildung 22). In den folgenden Wochen wurden die gestressten Pflanzen weiter beobachtet. Die Unterschiede zwischen den gestressten Pflanzen zu den Kontrollen bzw. zwischen den einzelnen Kreuzungsumgebungen (warm/kalt) waren aufgrund der hohen Standardabweichung und der geringen Probenzahl an den einzelnen Messzeitpunkten nicht signifikant (Abbildung 23). Wenn alle Daten pro Temperatur aufsummiert und unabhängig vom Messzeitpunkt betrachtet wurden, war bei den Nachkommen aus der kalten Kreuzungsumgebung (15018) die Chlorophyllfluoreszenz signifikant niedriger. Dies wies auf eine stärkere Schädigung der Nachkommen aus der kalten Kreuzungsumgebung hin. Die Pflanzen, die mit –25 °C gestresst wurden, aber bis zum nächsten Morgen bei 2 °C in der Kammer blieben, zeigten weniger Schäden in Form von braunverfärbten Nadeln, als die, die bei –15 °C bzw. –20 °C aus der Klimakammer entfernt und in das Gewächshaus (10 °C) zurückgestellt worden waren. Auch hier waren nach dem Zusammenfassen der Chlorophyllfluoreszenzdaten pro Temperatur die Fichten der Samencharge 15018 durch Frost im Trend mehr geschädigt.



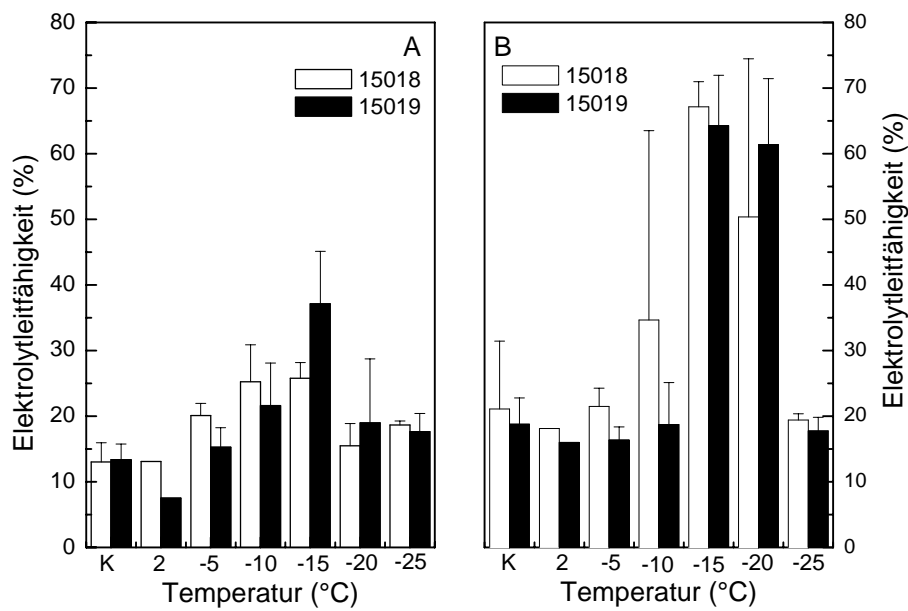
**Abbildung 22** Chlorophyllfluoreszenz während des Froststressversuchs an den Nachkommen aus den verschiedenen Kreuzungsumgebungen (15018 = kalt, 15019 = warm). Geschlossene Kreise markieren die Kontrollen, die offenen die gestressten Pflanzen. Jeder Punkt stellt den Mittelwert

aus Messungen von  $n = 3$  Individuen mit Standardabweichung dar. Der Stern kennzeichnet den signifikanten Unterschied der Chlorophyllfluoreszenz zwischen den Nachkommen bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .



**Abbildung 23** Chlorophyllfluoreszenz in gestressten Fichten 5, 7, 14 und 21 Tage nach dem Frost. Die weißen Säulen kennzeichnen die Pflanzen aus der kalten, schwarze Säulen die aus der warmen Kreuzungsumgebung. Jeder Punkt markiert den Mittelwert aus  $n = 3$  mit Standardabweichung.

Um zu prüfen, ob durch den Frost Membranschäden entstanden waren, wurden Nadeln direkt im Anschluss an den Stress und nach einer Woche im Hinblick auf „leakage“, das sich in der Erhöhung der Elektrolytleitfähigkeit äußert, gemessen. Die Elektrolytleitfähigkeit stieg mit sinkender Temperatur in der Kammer an und nahm bei den Pflanzen, die  $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$  ausgesetzt waren, sich aber bei  $2\text{ }^{\circ}\text{C}$  akklimatisieren konnten, wieder ab (Abbildung 24 A). Eine Woche nach dem Froststress nahm die Elektrolytleitfähigkeit von den Nadeln von den Pflanzen, die Temperaturen von  $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$  und  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  ausgesetzt waren, signifikant ( $P < 0,05$ ) gegenüber der Kontrolle zu (Abbildung 24 B). Dies deutet auf eine sich langsam entwickelnde Schädigung der Fichten hin. Das deutlich schlechtere Abschneiden von Pflanzen aus  $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$  und  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gegenüber denen aus  $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ , deutet darauf hin, dass erstere möglicherweise durch das abrupte Überführen in das  $10\text{ }^{\circ}\text{C}$  kühle Gewächshaus ( $\Delta T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$  bzw.  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), einen Hitzeschock erlitten hatten. Dieser Hitzeschock überdeckt oder verstärkt die tatsächlichen Schäden vom Froststress. Ein signifikanter Unterschied zwischen den Nachkommen aus den verschiedenen Kreuzungsumgebungen wurde bei einfachen Varianzanalysen nicht gefunden.



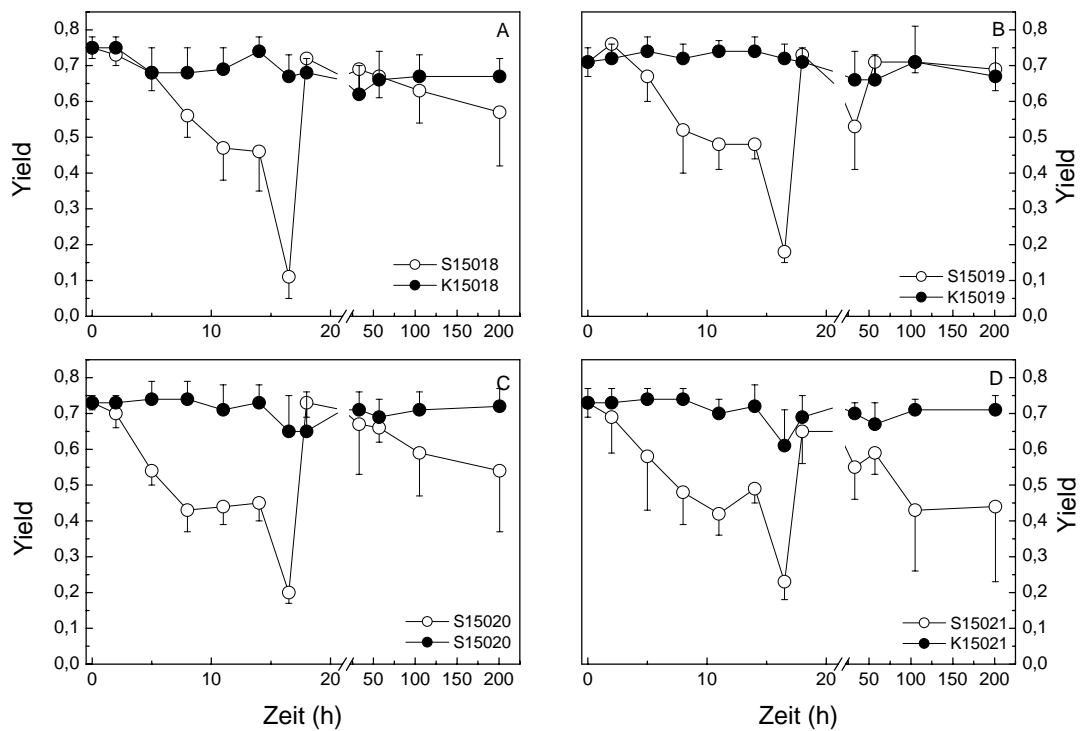
**Abbildung 24** Elektrolytleitfähigkeit von Fichtennadeln während (A) und 1 Woche nach dem Froststress (B). Die Säulen markieren die Mittelwerte aus  $n = 3$  plus Standardabweichung von Samencharge (15018) aus kalter Kreuzungsumgebung (weiß) und von der Samencharge (15019) aus warmer Kreuzungsumgebung (schwarz).

#### 4.1.5 Forststressexperimente 2 und 3

Zwei weitere Froststressexperimente wurden mit den Vollgeschwisterpaaren 15018/15019 und 15020/15021 im Februar 2004 durchgeführt (Frost 2 und Frost 3). Diese Herkünfte wurden verwendet, weil sie, wie alle anderen in dieser Arbeit untersuchten Vollgeschwister, aus Kreuzungen der gleichen Elternpaare im Gewächshaus (warm) und im Freien (kalt) stammten. Der Ablauf wurde im Vergleich zum Froststress 1 Versuch abgewandelt (3.1.2.). Um einen möglichen Hitzeschockeffekt zu vermeiden, verblieben die Pflanzen 17 h nach dem Froststress in der Klimakammer bei 2 °C und wurden dann in das Gewächshaus (10 °C) zurückgestellt. Die Chlorophyllfluoreszenz wurde auf jeder Temperaturstufe und im Anschluss an den Stress gemessen. Die Elektrolytleitfähigkeit wurde nach 0 h, 14 h, 33 h und 201 h gemessen. Zu diesen Zeitpunkten wurden die Pflanzen für weitere Analysen geerntet, die Größe gemessen und die Trockenmasse bestimmt.

Der im vorhergehenden Versuch beobachtete Unterschied, dass der „Yield“ auf der –20 °C kalten Temperaturstufe bei der Samencharge 15019 stärker abnahm als bei der Samencharge 15018, konnte nicht bestätigt werden (Abbildung 25 A, B). Auch in diesem Versuch verringerte sich der Wert  $F_v/F_m$  mit sinkender Temperatur und stieg bei

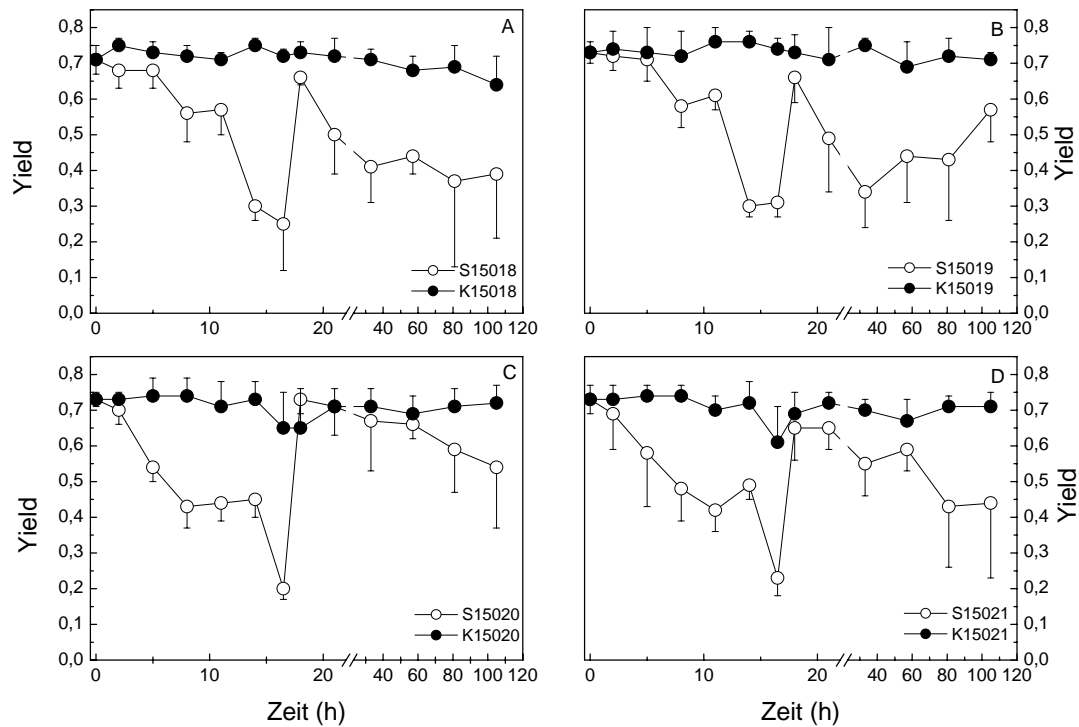
Erwärmung der Klimakammer auf 2 °C an. Bei allen Geschwisterpaaren war bis -25 °C der gleiche Kurvenverlauf von  $F_v/F_m$  zu beobachten. Im Anschluss wurde die Temperatur innerhalb von 1,5 h von -25 °C auf 2 °C erhöht. Die Chlorophyllfluoreszenz wurde beim Erreichen von 2 °C gemessen und ergab, dass sich die Werte der gestressten Pflanzen denen der Kontrolle wieder annäherten (Abbildungen 25, 26). 4 Tage nach dem Froststress begann die Chlorophyllfluoreszenz in den Chargen 15020 und 15021 zu sinken (Abbildung 25 C, D). Nach 8 Tagen war die Differenz zwischen Stress ( $0,44 \pm 0,21$ ) und Kontrolle ( $0,71 \pm 0,04$ ) bei 15021 signifikant ( $P < 0,05$ ). Die Chlorophyllfluoreszenzen innerhalb der Vollgeschwister 15020 und 15021 waren untereinander nicht signifikant verschieden, wenn einzelne Zeitpunkte verglichen wurden. Wenn die gemessenen Chlorophyllfluoreszenzwerte nach der Erholung bei 2°C und später im Gewächshaus pro Charge 15020/15021 aufsummiert und statistisch verglichen wurden, waren die Nachkommen aus der warmen Kreuzungsumgebung (15021) stärker geschädigt als die Nachkommen aus der kalten Kreuzungsumgebung (15020). Die  $F_v/F_m$  – Werte von den Samenchargen 15018 und 15019 verblieben nach dem Froststress auf dem Niveau der Kontrollen (Abbildung 25 A, B). Wenn man die Geschwisterpaare untereinander verglich, wurde deutlich, dass innerhalb der Nachkommen aus der warmen Kreuzungsumgebung die Samenscharge 15021 geringere  $F_v/F_m$  – Werte zeigte als die Samenscharge 15019 und damit stärker geschädigt zu sein schien (Abbildung 25 B, D).



**Abbildung 25** Chlorophyllfluoreszenz von dunkeladaptierten, frostgestressten Fichten zweier Vollgeschwisterfamilie aus verschiedenen Kreuzungsumgebungen: kalt A 15018, C 15020 und warm B 15019, D 15021. Geschlossene Kreise zeigen die Kontrollen, offene die gestressten Pflanzen. Jeder Punkt steht für den Mittelwert aus  $n = 5$  mit Standardabweichung.

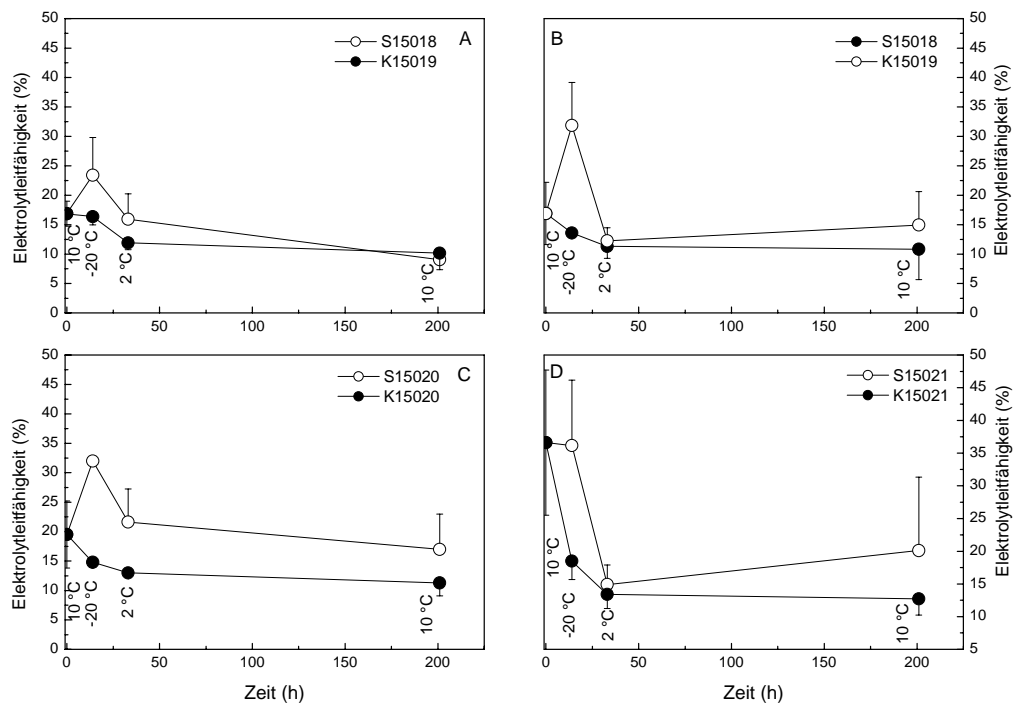
Froststressexperiment 3, das in gleicher Weise durchgeführt wurde wie der Froststressversuch 2, verursachte aus unbekanntem Gründen eine stärkere Schädigung der Nachkommen aller Samenchargen. Die Unterschiede von  $F_v/F_m$  zwischen den gestressten Pflanzen und den Kontrollen waren signifikant ( $P < 0,05$ ). Es waren keine Unterschiede zwischen warmgekreuzten und kaltgekreuzten Pflanzen zu erkennen (Abbildung 26).



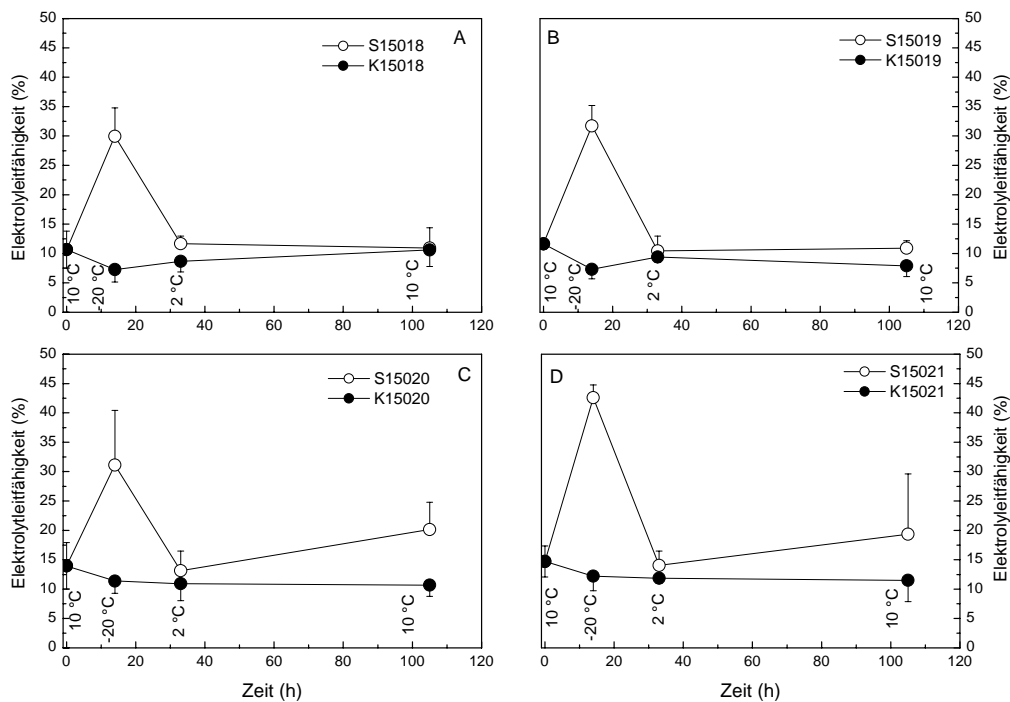


**Abbildung 26** Chlorophyllfluoreszenz von dunkeladaptierten, frostgestressten Fichten zweier Vollgeschwisterfamilie aus verschiedenen Kreuzungsumgebungen: kalt A 15018, C 15020 und warm B 15019, D 15021. Geschlossene Kreise zeigen die Kontrollen, offenen die gestressten Pflanzen. Jeder Punkt steht für den Mittelwert aus  $n = 5$  mit Standardabweichung.

Die Elektrolytleitfähigkeit in den Nadeln stieg mit sinkender Temperatur und fiel, nachdem die Temperatur in der Klimakammer wieder auf  $2^{\circ}\text{C}$  erhöht wurde (Abbildung 27). Im Froststressversuch 2 hatte die Samencharge 15019 aus der warmen Kreuzungsumgebung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  (14 h) eine signifikant ( $P < 0,05$ ) höhere Leitfähigkeit ( $31,8 \pm 7,3$ ) als die Vollgeschwister 15018 aus der kalten Kreuzungsumgebung ( $23,4 \pm 6,4$ , Abbildung 27 A, B). Diese Beobachtung konnte in der Wiederholung nicht bestätigt werden (Abbildung 28 A, B). Bei den anderen Vollgeschwistern gab es ähnliche Beobachtungen. Im Froststressversuch 3 war die Elektrolytleitfähigkeit bei  $-20^{\circ}\text{C}$  bei der warmgekreuzten Charge 15021 signifikant ( $P < 0,05$ ) höher ( $42,59 \pm 0,59$ ) als in kaltgekreuzten Charge 15020 ( $31,13 \pm 9,3$ , Abbildung 28 C, D). Im Froststressversuch 2 war dies nicht zu sehen (Abbildung 27 C, D). Zudem war in der Familie 15020/15021 die Elektrolytleitfähigkeit beim dritten Froststressversuch in den gestressten Pflanzen (20 %) signifikant ( $P < 0,05$ ) über der der Kontrollen (10%) (Abbildung 28 C, D). Dies wurde bei der Familie 15018/15019 nicht gefunden (Abbildung 28 A, B).



**Abbildung 27** Elektrolytleitfähigkeit im Frostversuch 2 bei Fichten, deren Eltern in einer kalten (15018 A, 15020 C) oder einer warmen (15019 B, 15021 D) Umgebung gekreuzt wurden. Offene Kreise kennzeichnen die gestressten Pflanzen, geschlossene die Kontrollen. Jeder Punkt markiert den Mittelwert aus  $n = 3$  mit Standardabweichung. Die Zahlen kennzeichnen die Temperaturen bei der die Proben genommen wurden.



**Abbildung 28** Elektrolytleitfähigkeit im Frostversuch 3 bei Fichten, deren Eltern in einer kalten (15018 A, 15020 C) oder einer warmen (15019 B, 15021 D) Umgebung gekreuzt wurden. Offene Kreise kennzeichnen die gestressten Pflanzen, geschlossene die Kontrollen. Jeder Punkt markiert den Mittelwert aus  $n = 3$  mit Standardabweichung. Die Zahlen kennzeichnen die Temperaturen bei der die Proben genommen wurden.

Bei den ermittelten Trockenmassen von Nadeln und Stämmen bzw. Zweigen konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen Froststress und Kontrolle gefunden werden. Auch gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen den zwei Vollgeschwisterpaaren (Tabellen 11 und 12). Dagegen waren die Unterschiede in der Größe der Setzlinge signifikant. Allerdings waren bei den Vollgeschwistern 15018 und 15019 im Schnitt die Nachkommen aus der warmen Kreuzungsumgebung signifikant ( $P < 0,05$ ) größer ( $32,58 \text{ cm} \pm 5,16$ ) als die aus der kalten Kreuzungsumgebung ( $29,85 \text{ cm} \pm 5,09$ ). Bei den anderen Vollgeschwistern 15020/15021 war es umgekehrt: kalt ( $25,72 \text{ cm} \pm 2,54$ ), warm ( $22,13 \text{ cm} \pm 2,88$ ), obwohl alle in der gleichen Umgebung kultiviert wurden.

**Tabelle 11** Trockenmassen von Nadeln (oben) und Stamm/Zweigen (unten) aller Samenchargen vor, während und nach dem Froststressexperiment 2. Die Zahlen markieren Mittelwerte und Standardabweichung aus n = 3 bei den Kontrollen und n = 5 bei den gestressten Pflanzen.

Nadeln								
	Samencharge 15018		Samencharge 15019		Samencharge 15020		Samencharge 15021	
	Stress (g)	Kontrolle (g)	Stress (g)	Kontrolle (g)	Stress (g)	Kontrolle (g)	Stress (g)	Kontrolle (g)
10 °C		3,11 ± 0,48		2,46 ± 0,68		2,3 ± 0,5		3,13 ± 2,61
(-)20 °C	2,94 ± 1,26	2,14 ± 0,65	3,36 ± 0,6	2,55 ± 0,77	3,8 ± 0,21	1,92 ± 0,47	2,47 ± 0,5	1,95 ± 0,74
2 °C	2,39 ± 0,85	2,25 ± 0,54	2,94 ± 0,72	2,64 ± 0,46	2,87 ± 0,6	2,48 ± 0,7	2,32 ± 0,22	2,18 ± 0,5
10 °C	2,59 ± 0,99	2,58 ± 0,8	2,83 ± 0,35	2,1 ± 0,51	2,59 ± 0,08	2,64 ± 0,8	2,11 ± 0,59	1,75 ± 0,25
Stamm + Zweige								
	Samencharge 15018		Samencharge 15019		Samencharge 15020		Samencharge 15021	
	Stress (g)	Kontrolle (g)	Stress (g)	Kontrolle (g)	Stress (g)	Kontrolle (g)	Stress (g)	Kontrolle (g)
10 °C		2,61 ± 0,4		2,94 ± 0,46		2,12 ± 0,57		2,16 ± 0,86
(-)20 °C	1,99 ± 0,84	2,06 ± 0,73	3,38 ± 0,73	2,52 ± 0,73	2,19 ± 0,49	1,77 ± 0,3	1,7 ± 0,39	1,35 ± 0,52
2 °C	1,83 ± 0,43	2,16 ± 0,36	2,73 ± 0,53	2,86 ± 1,02	2,06 ± 0,35	2,35 ± 0,13	1,72 ± 0,31	1,69 ± 0,51
10 °C	2,42 ± 1,07	2,61 ± 0,74	2,72 ± 1,10	2,79 ± 0,52	2,13 ± 0,36	2,2 ± 0,7	1,3 ± 0,45	1,59 ± 0,16

**Tabelle 12** Trockenmassen von Nadeln (oben) und Stamm/Zweigen (unten) aller Samenchargen vor, während und nach dem Froststressexperiment 3. Die Zahlen markieren Mittelwerte und Standardabweichung aus n = 3 bei den Kontrollen und n = 5 bei den gestressten Pflanzen.

Nadeln								
	Samencharge 15018		Samencharge 15019		Samencharge 15020		Samencharge 15021	
	Stress (g)	Kontrolle (g)	Stress (g)	Kontrolle (g)	Stress (g)	Kontrolle (g)	Stress (g)	Kontrolle (g)
10 °C		2,85 ± 1,06		2,22 ± 0,12		2,38 ± 0,97		2,38 ± 0,88
(-)20 °C	2,14 ± 0,28	2,93 ± 0,47	2,71 ± 0,7	3,08 ± 0,61	2,85 ± 0,55	2,47 ± 0,47	2,26 ± 0,67	2,78 ± 0,32
2 °C	2,63 ± 0,34	2,52 ± 0,11	3,63 ± 0,62	3,64 ± 0,06	2,4 ± 0,36	2,55 ± 0,311	1,9 ± 0,61	2,63 ± 0,95
10 °C	2,32 ± 0,71	2,82 ± 0,87	2,74 ± 0,5	2,29 ± 0,08	2,71 ± 0,73	2,41 ± 0,01	1,85 ± 0,54	2,33 ± 0,11
Stamm + Zweige								
	Samencharge 15018		Samencharge 15019		Samencharge 15020		Samencharge 15021	
	Stress (g)	Kontrolle (g)	Stress (g)	Kontrolle (g)	Stress (g)	Kontrolle (g)	Stress (g)	Kontrolle (g)
10 °C		3,12 ± 0,89		1,98 ± 1,45		1,86 ± 0,48		1,65 ± 0,24
(-)20 °C	1,91 ± 0,23	2,9 ± 0,02	2,33 ± 0,81	2,73 ± 0,34	2,22 ± 0,25	1,81 ± 0,08	1,61 ± 0,49	2,1 ± 0,01
2 °C	2,49 ± 0,54	2,47 ± 0,66	3,36 ± 1,02	3,32 ± 0,8	1,81 ± 0,32	1,69 ± 0,16	1,26 ± 0,44	2,26 ± 0,3
10 °C	2,05 ± 0,4	2,68 ± 1,19	2,63 ± 0,37	2,96 ± 0,31	2,08 ± 0,3	2,01 ± 0,31	1,23 ± 0,18	2,44 ± 0,09

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Frostschädigung ungefähr 2 Tage nach dem eigentlichen Froststress auftrat. Es wurden geringe Unterschiede in der Elektrolytleitfähigkeit zwischen den im Gewächshaus gekreuzten und den im Freiland gekreuzten Pflanzen bei -20°C gefunden, die sich in der Wiederholung nicht bestätigen ließen. Der Verlauf der Chlorophyllfluoreszenzabnahme nach dem Froststress war verschieden zwischen 15018/15019 und 15020/15021. Nur die Vollgeschwister 15020/15021 zeigten Unterschiede zwischen der warmen oder kalten Kreuzungsumgebung innerhalb der Vollgeschwisterfamilien.

## **4.2 *Arabidopsis thaliana***

Da die kontrollierte Kreuzung von Fichten schwierig ist und Experten erfordert (siehe 1.4 Einleitung), sollte geprüft werden, ob sich die Kreuzungstemperatur auf die Stressresistenz von *Arabidopsis*, die ein einfacher handhabbares Modellsystem darstellt, auswirkt. Dazu wurde *Arabidopsis thaliana* unter zwei verschiedenen Temperaturbedingungen (15 °C und 25 °C) gekreuzt. Diese Kreuzungsversuche wurden im Jahr 2003 und 2004 jeweils einmal durchgeführt. Die Samen aus diesen Versuchen wurden geerntet und bei 4 °C aufbewahrt. Die Samen wurden zusammen unter den gleichen Bedingungen (20°C) zunächst auf Wurzelmedium ausgelegt und die Pflanzen weiter auf Erde angezogen, um zu prüfen, ob die Kreuzungstemperatur einen Effekt hat (siehe 2.2).

### **4.2.1 Nährstoffanalyse der Samen**

Die Samen aus der warmen (25 °C) und der kalten Kreuzungsumgebung (15 °C) unterschieden sich in der Farbe. Die Samen der kalten Kreuzungsumgebung waren etwas heller braun als die Samen aus der warmen Kreuzungsumgebung. Des Weiteren waren die Samen aus der warmen Kreuzungsumgebung signifikant ( $P < 0,05$ ) schwerer als die aus der kalten Kreuzungsumgebung (siehe Tabelle 13). Dies traf für beide Kreuzungsjahre (2003/2004) zu.

Das C/N-Verhältnis in den Samen aus der kalten Kreuzungsumgebung war signifikant höher als bei den Samen aus der warmen Kreuzungsumgebung. Das lag in der Hauptsache daran, dass der Stickstoffanteil in Samen aus der kalten Kreuzungsumgebung deutlich geringer war als in denen aus der warmen Kreuzungsumgebung ( $2,6 \pm 0,028$  versus  $3,53 \pm 0,047$ ). Dagegen war der Anteil an löslichen Gesamtzuckern in Samen aus kalter Kreuzungsumgebung signifikant ( $P < 0,05$ ) höher als in Samen aus warmer Kreuzungsumgebung. Die Analyse einzelner Zuckern wie Glucose, Fructose oder Saccharose brachte dagegen keine eindeutigen Ergebnisse. Auch bei der Stärke gab es keine signifikanten Unterschiede (siehe Tabelle 13).

**Tabelle 13** Gehalt an Speicherstoffen in den Samen aus warmer und kalter Kreuzungsumgebung aus den Kreuzungsjahren 2003 und 2004. Jede Zahl ist der Mittelwert aus  $n = 3$  und Standardabweichung.

	<i>Kreuzung 2003</i>		<i>Kreuzung 2004</i>	
	15 °C	25 °C	15 °C	25 °C
Gewicht ( $\mu\text{g}/\text{Samen}$ )	19,54 $\pm$ 0,15	28,92 $\pm$ 0,09	17,12 $\pm$ 0,1	20,95 $\pm$ 0,17
C (%)	58,78 $\pm$ 0,22	56,48 $\pm$ 1,34	59,57 $\pm$ 0,54	56,01 $\pm$ 0,55
N (%)	2,35 $\pm$ 0,006	3,34 $\pm$ 0,11	2,6 $\pm$ 0,023	3,53 $\pm$ 0,04
lösl. Gesamtzucker (mg/g FG)	26,34 $\pm$ 1,2	22,85 $\pm$ 0,911	28,6 $\pm$ 0,54	26,7 $\pm$ 0,906
Glucose (mg /g FG)	1,44 $\pm$ 0,49	1,04 $\pm$ 0,12	0,94 $\pm$ 0,18	1,21 $\pm$ 0,05
Fructose (mg/g FG)	0,36 $\pm$ 0,93	0,22 $\pm$ 1,01	0,26 $\pm$ 0,6	0,27 $\pm$ 0,26
Sacharaose (mg/g FG)	x	x	x	x
Stärke (mg/g FG)	1,12 $\pm$ 0,11	0,94 $\pm$ 0,39	0,80 $\pm$ 0,44	1,1 $\pm$ 0,29

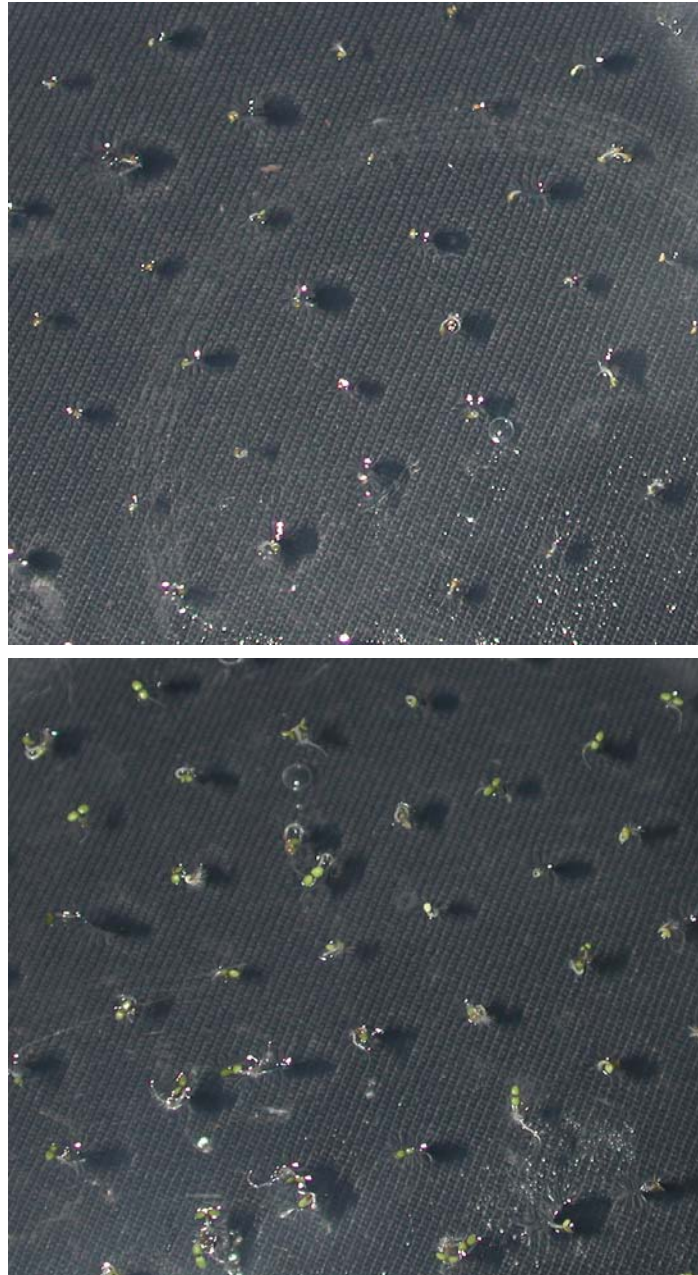
Die Fettsäureprofile von den Samen aus der kalten Kreuzungsumgebung (15 °C) und der warmen Kreuzungsumgebung (25 °C) zeigten deutliche Unterschiede. So war der Gehalt an Palmitinsäure (16:0), Palmitoleinsäure (16:1), Stearinsäure (18:0), alpha Linoleinsäure (18:3), Arachinsäure (20:0), Gadosäure (20:1), Delta 11 cis/14 cis Icosadiensäure (20:1) und Erucasäure (22:1) in den Samen aus 15 °C signifikant ( $P < 0,05$ ) höher als in den Samen aus 25 °C (Tabelle 5). Nur der Anteil von Ölsäure (18:1 9 Z) war in den Samen aus der warmen Kreuzungsumgebung signifikant ( $P < 0,05$ ) höher. Cis-Vaccensäure (18:1 11Z), Linolsäure (18:2) und Behensäure (22 :0) waren in den Samen beider Kreuzungsumgebungen in ähnlichen Konzentrationen vorhanden. Die Summe aller Fettsäuren war in den Samen aus der kalten Kreuzungsumgebung höher als in dem Samen aus der warmen Kreuzungsumgebung. Innerhalb dieses Fettsäureprofils waren die prozentualen Anteile der gesättigten Fettsäuren an der jeweiligen Gesamtsumme in den Samen aus der kalten Kreuzungsumgebung höher (13,42 %/ 13,89 %) als in den Samen aus der warmen Kreuzungsumgebung (11,4 %/ 12,58 %). Umgekehrt war der Anteil der ungesättigten Fettsäuren in den Samen aus der warmen Kreuzungsumgebung etwas höher (88,6 %/ 87,41 %) als in den Samen aus der kalten Kreuzungsumgebung (86,56 %/ 86,1 %).

**Tabelle 14** Fettsäureprofil von Samen aus der kalten Kreuzungsumgebung (15 °C) und der warmen Kreuzungsumgebung (25 °C) aus den Kreuzungsjahren 2003 und 2004. Jede Zahl markiert den Mittelwert aus n = 6 mit Standardabweichung.

Name	Symbol	Kreuzung 2003		Kreuzung 2004	
		15 °C (µmol/g FG)	25 °C (µmol/g FG)	15 °C (µmol/g FG)	25 °C (µmol/g FG)
Palmitinsäure	16:0	95,08 ± 7,37	75,88 ± 1,51	98,37 ± 1,78	72,31 ± 2,6
Palmitoleinsäure	16:1	3,69 ± 0,39	3,06 ± 0,35	4,55 ± 0,19	3,27 ± 0,39
Stearinsäure	18:0	39,76 ± 2,2	29,46 ± 1,29	42,71 ± 1,5	28,9 ± 1,26
Ölsäure	18:1 (9Z)	161,97 ± 14,88	251,98 ± 5,63	147,07 ± 4,89	183,65 ± 12,55
cis-Vaccensäure	18:1 (11Z)	19,11 ± 0,92	21,88 ± 0,89	20,69 ± 0,77	18,74 ± 0,55
Linolsäure	18:2 (9Z, 11Z)	352 ± 33,06	337 ± 11,34	355 ± 9,66	300,35 ± 17,31
alpha-Linolensäure	18:3 (9Z, 11Z, 15Z)	228,32 ± 27,96	142,45 ± 6,59	244,77 ± 9,68	150,79 ± 16,20
Arachinsäure	20:0	21,33 ± 1,17	18,65 ± 1,07	23,29 ± 1,4	18,44 ± 0,8
Godosäure	20:1 (11Z)	218,74 ± 14,87	197,64 ± 7,25	218,3 ± 6,75	165,55 ± 6,16
Delta-11-cis, 14-cis Icosadiensäure	20:2 (11Z, 14Z)	26,01 ± 2,2	14,64 ± 0,57	25,94 ± 0,37	15,59 ± 0,68
Behensäure	22:0	3,27 ± 1,73	2,57 ± 0,32	2,49 ± 0,45	2,78 ± 0,72
Erucasäure	22:1 (13Z)	18,56 ± 1,56	14,69 ± 1,11	17,61 ± 1,22	12,84 ± 0,61
<b>Gesamtsumme</b>		<b>1187,84</b>	<b>1109,9</b>	<b>1200,79</b>	<b>973,21</b>

#### 4.2.2 Keimung und Blattzuwachs

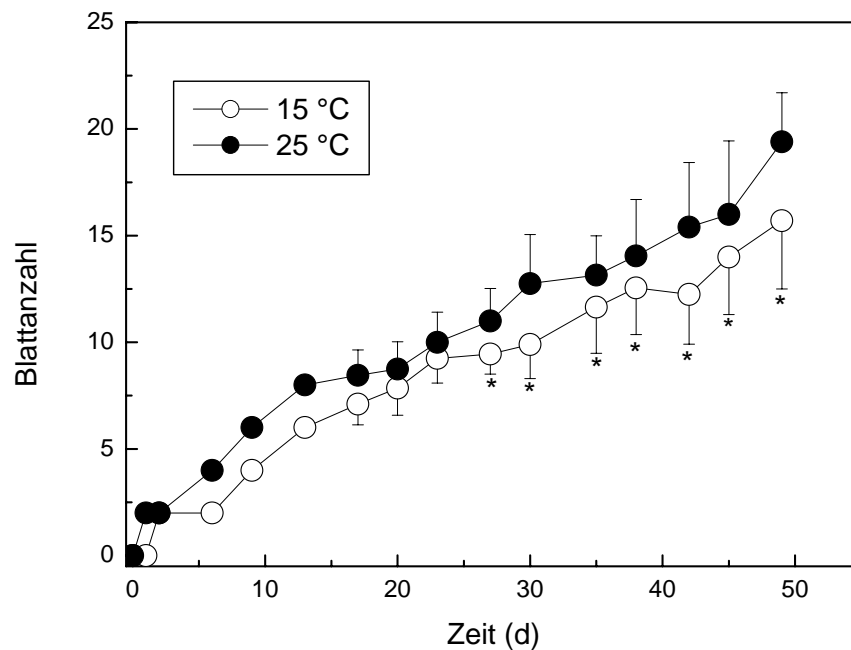
Nach zwei Tagen Keimung bei 20 °C hatten die Samen aus der warmen Kreuzungsumgebung (25 °C) mehrheitlich Wurzeln ausgetrieben. Bei den Samen aus der kalten Kreuzungsumgebung (15 °C) war noch nichts zu sehen. Nach drei Tagen hatten die Samen aus der warmen Kreuzungsumgebung (25 °C) mehrheitlich sowohl Wurzeln, als auch das erste Blattpaar ausgetrieben, die aus der kalten Kreuzungsumgebung (15 °C) nur die Wurzeln (Abbildung 23).



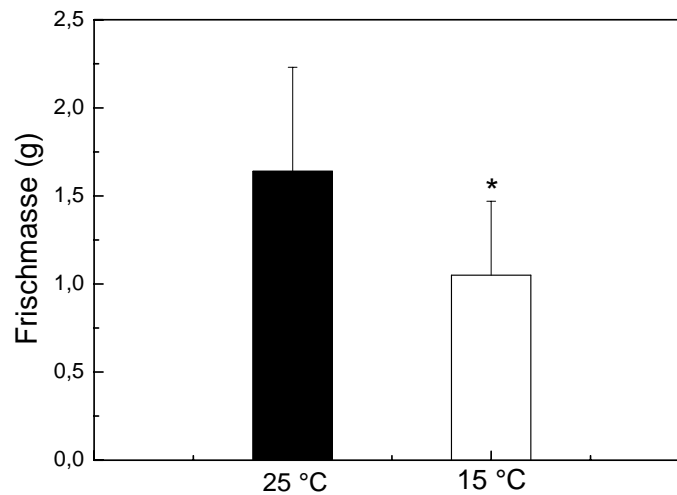
**Abbildung 29** Keimung der Samen von *Arabidopsis thaliana* aus 15 °C Kreuzungsumgebung (oben) und aus 25 °C warmer Kreuzungsumgebung (unten) nach 3 Tagen. Die Samen keimten auf Wurzelmedium bei 20 °C und 55 % Luftfeuchte.



Der Vorsprung von einem Blattpaar, den die Pflanzen aus der warmen Kreuzungsumgebung hatten, wurde im weiteren Verlauf des Wachstums beibehalten. Auch nach dem Umsetzen der Pflanzen auf Erde hatten die Nachkommen aus der warmen Kreuzungsumgebung einen signifikanten ( $P < 0,05$ ) Vorsprung von einem oder zwei Blättern gegenüber den Nachkommen aus der kalten Kreuzungsumgebung (Abbildung 30). Dies wiederum wirkte sich geringfügig aber signifikant auf die Frischmasse aus. Diese war bei den warmgekreuzten Pflanzen im Trend höher als in den kaltgekreuzten (Abbildung 31).



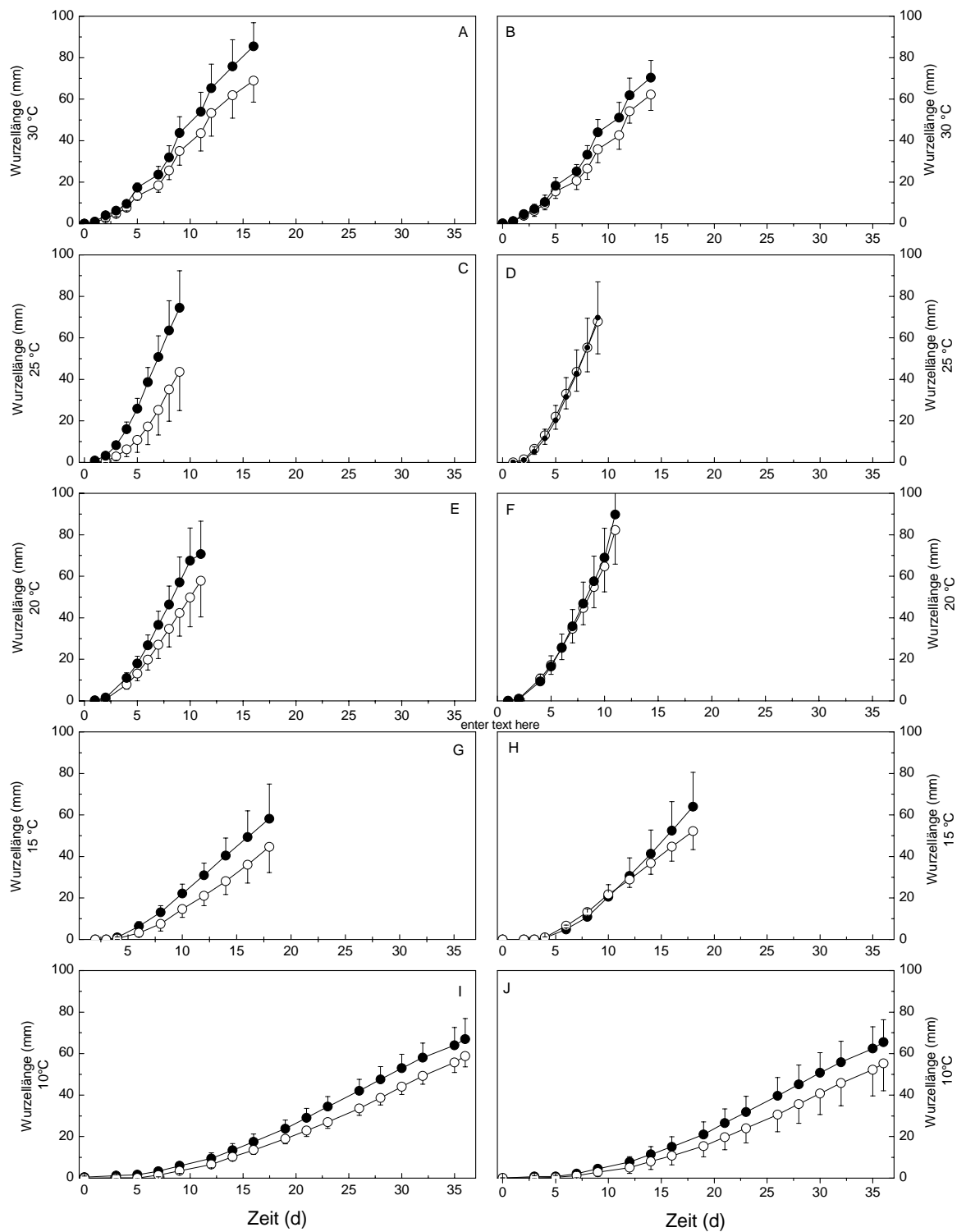
**Abbildung 30** Gesamtblattanzahl von *Arabidopsis thaliana* aus Samen von kaltgekreuzten (offene Kreise) und warmgekreuzten (geschlossene Kreise) Mutterpflanzen. Jeder Punkt steht für einen Mittelwert aus  $n = 15$  mit Standardabweichung. Die Pflanzen wuchsen zu Beginn auf Wurzelmedium und wurden nach 18 Tagen auf Erde pikiert.



**Abbildung 31** Frischgewicht der Blattrosetten von *Arabidopsis thaliana* aus warmer (schwarz) und kalter (weis) Kreuzungsumgebung. Die Pflanzen wurden nach 42 Tagen Wachstum auf Wurzelmedium und Erde geerntet. Jeder Punkt markiert den Mittelwert aus  $n = 10$  mit Standardabweichung.

### 4.2.3 Wurzelwachstum

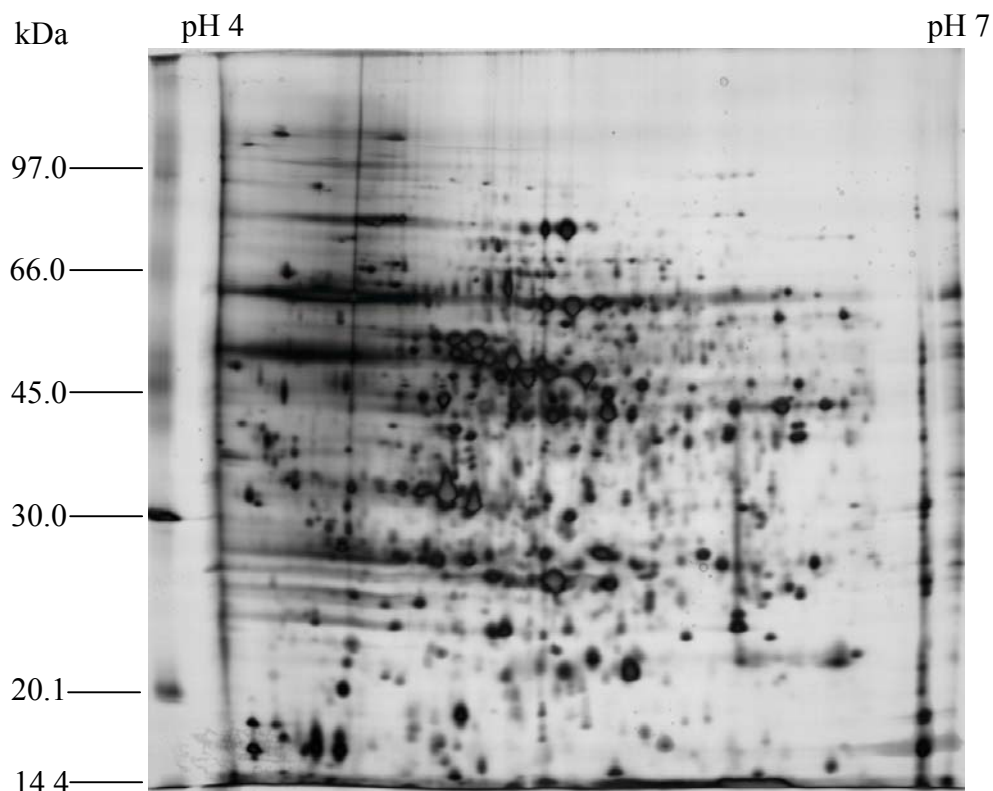
Das Wurzelwachstum der Samen aus den verschiedenen Kreuzungsumgebungen wurde unter 5 verschiedenen Umgebungstemperaturen beobachtet. Für die Samen aus 2004 zeigte sich, dass die Wurzeln der Nachkommen aus der warmen Kreuzungsumgebung signifikant ( $P < 0,05$ ) schneller wuchsen als die der Nachkommen aus der kalten Kreuzungsumgebung (Abbildung 32 A, C, E, G, I). Bei den Nachkommen aus dem Jahr 2003 waren die Unterschiede im Wurzelwachstum zwischen warmer und kalter Kreuzungstemperatur ebenfalls signifikant, wenn das Wurzelwachstum bei 10 °C, 15 °C und 30 °C stattfand (Abbildung 32 B, H, J). Bei Temperaturen von 20 °C und 25 °C zeigten die Nachkommen von 2003 aus kalter und warmer Kreuzungsumgebung gleiches Wurzelwachstumsverhalten (Abbildung 32 D, F).



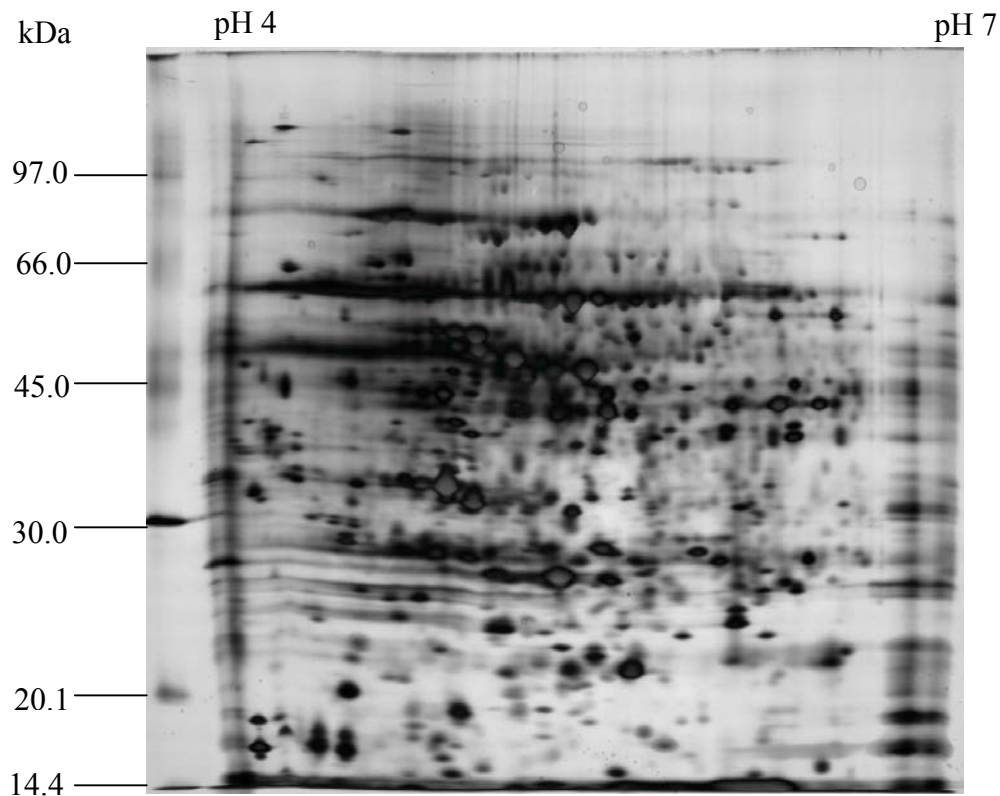
**Abbildung 32** Wurzelwachstum der Pflanzen aus Samen aus kalter (offene Kreise) und warmer (geschlossene Kreise) Kreuzungsumgebung unter 30 °C (A,B), 25 °C (C, D), 20 °C (E, F), 15 °C (G, H) und 10 °C (I, J). Jeder Punkt markiert den Mittelwert aus  $n = 25$  mit Standardabweichung.

#### 4.2.4 2-D-Elektrophorese

Mit Hilfe der zweidimensionalen Elektrophorese wurde bei *Arabidopsis thaliana* das Proteinmuster von den Nachkommen aus kalter (15 °C) und warmer (25 °C) Kreuzungsumgebung verglichen. Die Arbeitsgruppe in Freisingen (AG Prof. Müller-Starck, TU München) konnte keine Unterschiede in der Methylierung der Gesamt-DNA finden (Baumann 2004). Die Werte des Methylierungsgrades der DNA lagen zwischen 4,6 % für die Nachkommen aus der warmen Kreuzungsumgebung und 4,4 % für die Nachkommen aus der kalten Kreuzungsumgebung. In dieser Arbeit wurde Blattmaterial von 7 Wochen alten Kontrollpflanzen, die bei 20 °C auf Erde gewachsen waren, untersucht. Es konnten im Gegensatz zu den Fichten keine wiederholbaren und damit signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Kreuzungsumgebungen anhand der Spotzusammensetzung festgestellt werden. Auch eine genauere Auftrennung im pH-Bereich 4-7 bei der isoelektrischen Fokussierung führte zu keinem signifikanten Ergebnis (Abbildungen 33, 34).



**Abbildung 33** Zweidimensionale Auftrennung von Blattproteinen aus *Arabidopsis* von Nachkommen aus der warmen Kreuzungsumgebung (25 °C). Die isoelektrische Fokussierung fand im pH-Bereich 4-7 statt, die Auftrennung nach dem Molekulargewicht auf 12%igen Gelen. Die Gele wurden silbergefärbt.



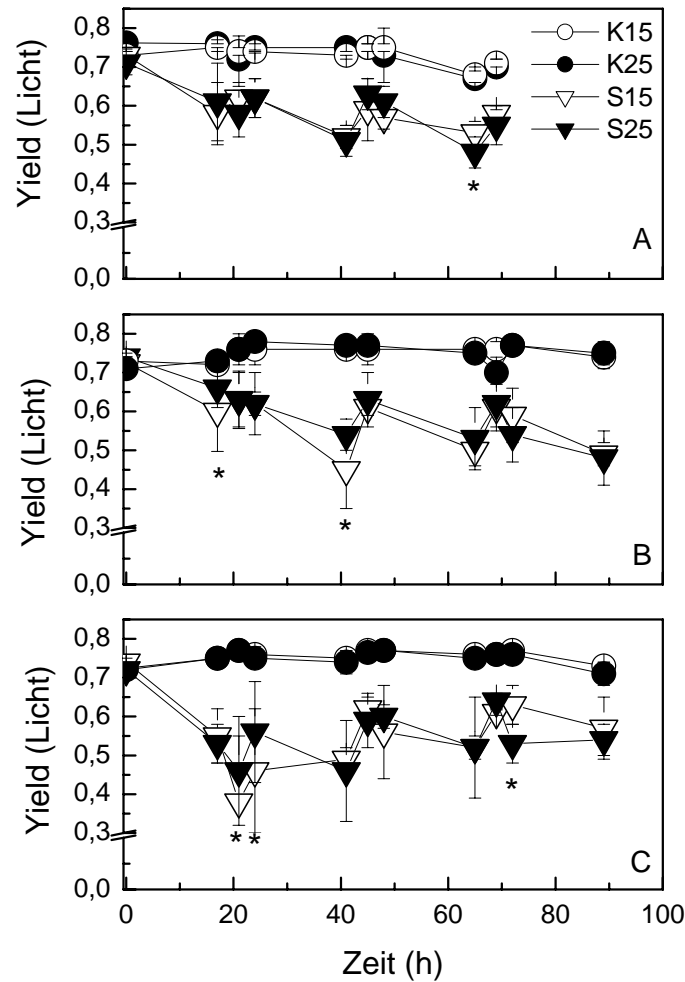
**Abbildung 34** Zweidimensionale Auftrennung von Blattproteinen aus Arabidopsis von Nachkommen aus der kalten Kreuzungsumgebung (15 °C). Die isoelektrische Fokussierung fand im pH-Bereich 4-7 statt, die Auftrennung nach dem Molekulargewicht auf 12%igen Gelen. Die Gele wurden silbergefärbt.

#### 4.2.5 Kältestress

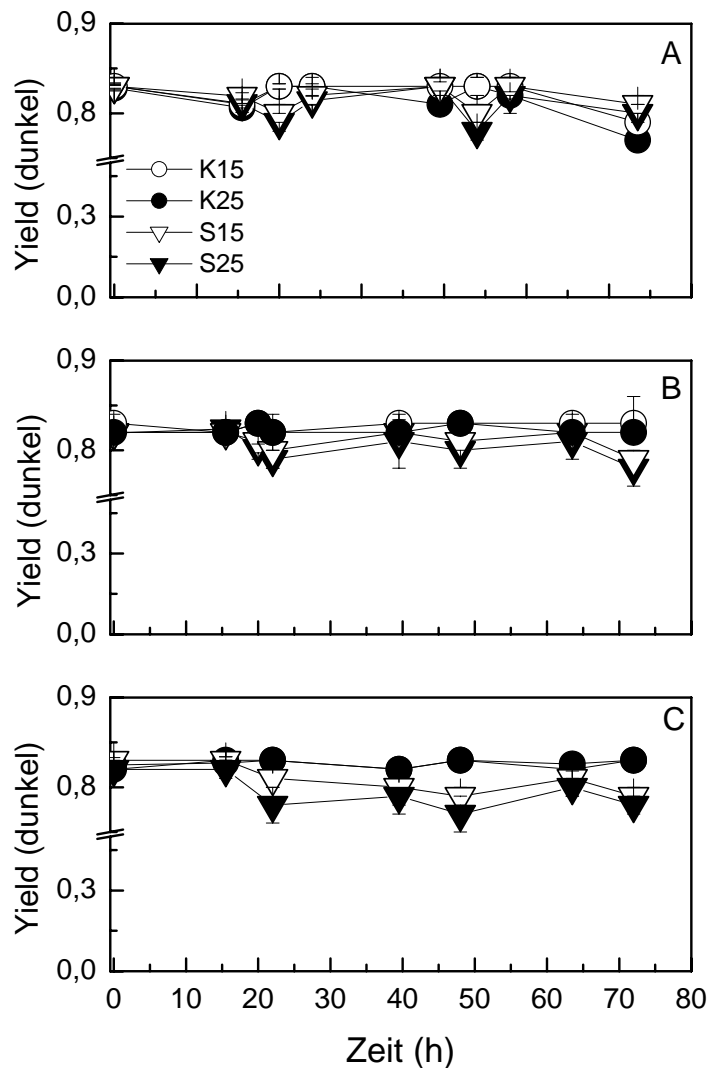
Die Arabidopsispflanzen wurden in einem Alter von sieben Wochen einem Kältestress von  $3 \pm 1$  °C für vier Tage ausgesetzt. Der Kältestress wurde durch schnelles Abkühlen der Kammer von 20 °C auf 3 °C innerhalb 1 h induziert. In den Kälteexperimenten 1 und 3 wurden Nachkommen aus dem Samen der Kreuzung 2004 verwendet. Im Kälteexperiment 2 wurden Nachkommen aus dem Samen der Kreuzung 2003 verwendet, um beobachtete Unterschiede zu bestätigen oder zu falsifizieren.

Die im Licht gemessene Chlorophyllfluoreszenz war bei den Nachkommen aus der kalten (15 °C) Kreuzungsumgebung in den ersten 24 h des Kältestresses signifikant geringer als bei den Nachkommen aus der warmen (25 °C) Kreuzungsumgebung. Dies traf vor allen Dingen auf die Messwerte zu, die 1 h nach „Tagesbeginn“ erhoben wurden. Die Unterschiede waren am deutlichsten in den Kälteexperimenten 2 und 3 (Abbildung 35 B, C). Danach regelten sich die Chlorophyllfluoreszenzwerte der Pflanzen aus der kalten Kreuzungsumgebung auf dem Level der Nachkommen aus der warmen Kreuzungsumgebung ein. Erst gegen Ende des Versuches sank die Chlorophyllfluoreszenz der warmgekreuzten Pflanzen etwas unter die der kaltgekreuzten Pflanzen. Dies war im

ersten Kälteexperiment (Abbildung 35 A) und im dritten Kälteexperiment (Abbildung 35 C) signifikant. Die Chlorophyllfluoreszenz der dunkeladaptierten Pflanzen bei Kälte und der Kontrollen bei Licht bzw. Dunkelheit zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Kreuzungsumgebungen (Abbildung 36 A, B, C).



**Abbildung 35** Chlorophyllfluoreszenz von Arabidopsis im Licht bei Kältestress. Gezeigt werden die Ergebnisse aus den Kälteexperimenten 1 (A), 2 (B) und 3 (C). Offene Symbole markieren die Nachkommen aus der kalten Kreuzungsumgebung, geschlossene die aus der warmen Kreuzungsumgebung. Dreiecke kennzeichnen die gestressten Pflanzen, Kreise die Kontrollen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus  $n = 6$  und die Standardabweichung.



**Abbildung 36** Chlorophyllfluoreszenz von Arabidopsis im Dunkeln bei Kältestress. Gezeigt werden die Ergebnisse aus den Kälteexperimenten 1 (A), 2 (B) und 3 (C). Offene Symbole kennzeichnen die Nachkommen aus der kalten Kreuzungsumgebung, geschlossene die aus der warmen Kreuzungsumgebung. Dreiecke markieren die gestressten Pflanzen, Kreise die Kontrollen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus  $n = 6$  und die Standardabweichung.

#### 4.2.6 Genexpressionsanalysen

Aus den zuvor beschriebenen Kälteexperimenten wurden nach vier Tagen Blattproben geerntet. Aus den Blattproben der Kälteexperimente 1 und 3 wurde aus je drei Mischproben pro Stress und Kontrolle und Kreuzungsumgebung RNA isoliert (3.4.1). Um zunächst eine Übersicht zu erhalten, ob generell zwischen den Nachkommen beider Kreuzungsumgebungen Gene verschieden reguliert sind, wurden je eine Kontrolle der Nachkommen aus Samen aus warmer ( $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) und kalter Kreuzungsumgebung ( $15\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) genommen. Diese Kontrollen stammten aus dem Kälteexperiment 3 und wurden für die Expressionsanalyse mittels Filterhybridisierung, wie in 3.4.2 beschrieben, verwendet. Die

Filter wurden mit dem Array Vision TM Version 8.0 Programm ausgewertet. Die Genexpression auf dem Filter mit der Kontrolle von den Nachkommen aus der warmen Kreuzungsumgebung wurde gegen die Genexpression in der Kontrolle der Nachkommen aus der kalten Kreuzungsumgebung verglichen (siehe Anhang). Es wurde aufgrund der einmaligen Durchführung dieser Analyse ausschließlich nach Genen gesucht, die sich mindestens um den Faktor 3 unterschieden. Insgesamt 19 Gene unterschieden sich um diesen Faktor und sind in Tabelle 15 zusammengefasst. Innerhalb dieser 19 Gene waren 13 Gene in den Nachkommen der warmen Kreuzungsumgebung im Vergleich zu den Nachkommen aus der kalten Kreuzungsumgebung schwächer und 6 stärker exprimiert.



**Tabelle 15** Unterschiedlich regulierte Gene in Blattproben der Nachkommen von Arabidopsis aus verschiedenen temperierten Kreuzungsumgebungen.

Position	AGI-Code	Name	signifikant reguliert
10 A-3	At3g51240	flavanone-3-hydroxylase (F3H)	-
10 H-2	At1g69490	no apical meristem (NAM) family protein	-
14 I-4	At3g46600	scarecrow-like protein/scarecrow transcription factor family protein	-
16 A-3	At1g66160	U-box domain-containing protein, similar to immediate-early fungal elicitor protein CMPG1 ( <i>Petroselinum crispum</i> )	-
16 K-4	At4g36990	encodes a protein whose sequence is similar to heat shock factors that regulate the expression of heat shock proteins.	-
17 B-1	At2g33310	auxin regulated protein (IAA13)	-
19 P-2	At2g46680	homeobox-leucine zipper protein 7 (HB-7) / HD-ZIP transcription factor 7	+
2 D-1	At1g68200	putative zinc finger protein	-
20 E-1	At1g14200	zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein	+
23 C-4	At2g46790	pseudo-response regulator 9	+
23 N-2	At3g61890	homeobox-leucine zipper protein 12 (HB-12) / HD-ZIP transcription factor 12	+
24 B-1	At3g16770	AP2 domain containing protein RAP2.3	+
24 F-1	At1g04370	encodes a member of the ERF (ethylene response factor) subfamily B-3 of ERF/AP2 transcription factor family. The protein contains one AP2 domain.	+
4 A-3	At4g21960	peroxidase prxr1	-
4 H-1	At4g18770	MYB98 putative transcription factor (MYB98) mRNA, complete cds	-
5 A-1	At2g01150	RING-H2 finger protein RHA2b	-
6 B-1	At1g34790	Transparent Testa 1 (TT1)	-
8 A-3	At3g18780	actin 2	-
8 G-4	At1g27730	Related to Cys2/His2-type zinc-finger proteins found in higher plants.	-

Aus diesen Genen wurden 4 Gene ausgewählt: At1g69490 (NAM: no apical meristem family Protein), At3g51240 (Flavanon-3-hydroxylase), At2g790 (pseudo response regulator 9 Gen) und At3g16770 (AP2 containing protein RAP 2.3). Die beiden ersteren waren in den Nachkommen aus der warmen Kreuzungsumgebung schwächer, die letzten beiden stärker exprimiert. Diese Gene wurden mit der Real Time PCR unter Verwendung von synthetisierten Primern genauer untersucht, um die Ergebnisse aus der Filterhybridisierung zu überprüfen.

Bei der Real Time PCR wurden je drei Mischproben von gestressten Pflanzen und den Kontrollen der Nachkommen aus beiden Kreuzungsumgebungen analysiert. Die Proben aus den Kälteexperimenten 1 und 3 wurden separat analysiert und wie im Material und

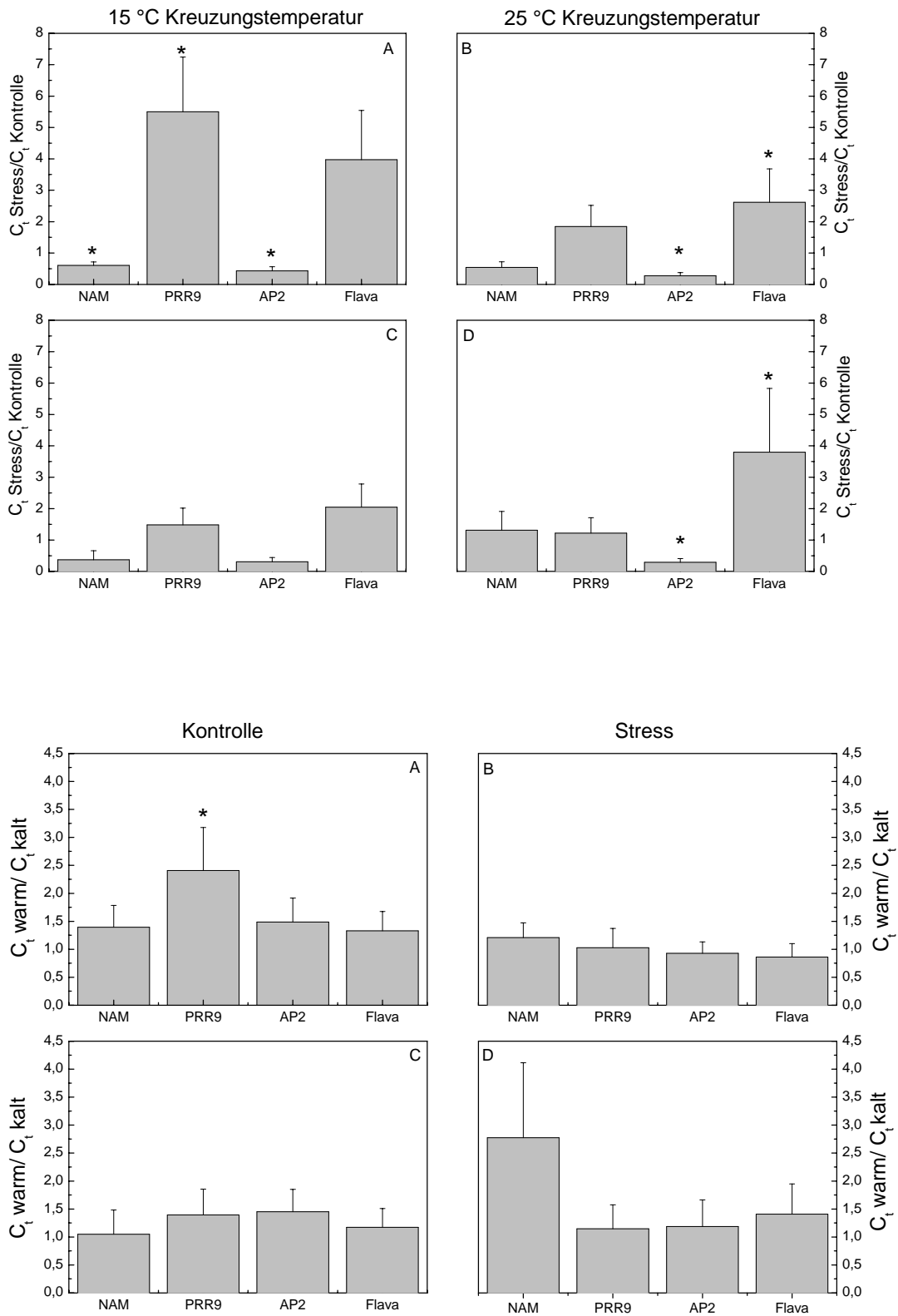
Methodenteil ausgewertet (3.4.4). Jedes der vier Gene wurde in seiner Expression analysiert. Als Referenz diente die gesamte Transskriptmenge der 18 S rRNA.

Wenn die relative Genexpression in den Kontrollpflanzen der Nachkommen aus warmer und kalter Kreuzungsumgebung untereinander verglichen wurde, war im Kälteexperiment 1 das pseudo response regulator 9 Gen (PRR 9) in den Nachkommen aus der warmen Kreuzungsumgebung signifikant stärker (Abbildung 37 A). Dies konnte in dem Vergleich der Kontrollpflanzen aus dem Kälteexperiment 3 nicht bestätigt werden (Abbildung 37 C). Die anderen Gene unterschieden sich in ihrer Expression nicht signifikant voneinander. Bei dem Vergleich der kältegestressten Pflanzen von Nachkommen aus kalter und warmer Kreuzungsumgebung untereinander war keines der untersuchten Gene signifikant verschieden reguliert (Abbildung 37 B, D).

In einer weiteren Auswertung der gleichen Real-Time PCR Ergebnisse wurde die relative Genexpression der gestressten Pflanzen im Vergleich zur Kontrolle innerhalb der Nachkommen aus warmer und kalter Kreuzungsumgebung verglichen. Bei den Nachkommen aus der warmen Kreuzungsumgebung waren das Gen für ein eine AP2 Domäne tragendes RAP 2.3 Protein (AP 2) im Vergleich zur Kontrolle in beiden Kälteexperimenten signifikant schwächer exprimiert und das Gen der Flavanon-3-hydroxylase (Flava) stärker (Abbildung 38 B, D). Bei den Nachkommen aus der kalten Kreuzungsumgebung war im Kälteexperiment 1 die Expression des AP2 und des no apical meristem family Proteins (NAM) im Vergleich zur Kontrolle signifikant geringer, die vom pseudo response regulator 9 Gen (PRR 9) war signifikant stärker (Abbildung 38 A). Im Kälteexperiment 3 war dieser Unterschied nicht zu sehen (Abbildung 38 C).

**Abbildung 37 (nächste Seite oben)** Relative Genexpression in Blättern der Nachkommen der warmen (25 °C) Kreuzungsumgebung im Vergleich zu der in den Nachkommen aus der kalten (15°C) Kreuzungsumgebung. Verglichen wurden die Kontrollen und gestressten Pflanzen aus dem Kälteexperiment 1 (A, B) und dem Kälteexperiment 3 (C, D) untereinander. Säulen stellen den Mittelwert aus n=3 und die Standardabweichung dar.

**Abbildung 38 (nächste Seite unten)** Relative Genexpression in Blättern von kältegestressten Pflanzen um Vergleich zu den Kontrollen innerhalb der Nachkommen aus kalter (A, C) und warmer (B, D) Kreuzungsumgebung. Es werden Ergebnisse aus den Kälteexperimenten 1 (A, B) und 3 (C, D) dargestellt. Die Säulen stellen den Mittelwert aus n=3 Proben mit Standardabweichung dar.



## 5 Diskussion

### 5.1 *Gemeine Fichte (Picea abies [Karst.] L.)*

Die Fichte interagiert, wie alle Organismen, mit der Umwelt. Die Umwelteinflüsse können während dieser Interaktion Veränderung im Genotypen dahingehend bewirken, dass über Methylierungen regulatorisch wichtiger Regionen der Genexpressionen verändert werden. Diese Veränderungen der Regulation/Expression von Genen können an Nachkommen weitervererbt werden und ihren Charakter beeinflussen, ohne das Genom an sich zu verändern. Innerhalb dieser Arbeit wurde die Anpassbarkeit der Fichte an Frost und Trockenheit untersucht. Der Schwerpunkt lag dabei auf dem Einfluss der Temperatur während der Kreuzung auf das Verhalten der Nachkommen in bezug auf die beiden Stressarten. Es wurden Elternklone gezielt im Gewächshaus (warm) oder im Freien (kalt) gekreuzt. Wenn Nachkommen dieser Kreuzungsumgebungen Frost ausgesetzt wurden, zeigte sich, dass die Nachkommen aus der warmen Kreuzungsumgebung frostempfindlicher waren als ihre Vollgeschwister aus der kalten Kreuzungsumgebung (Johnsen et al. 1995). Dies wurde durch den Bräunungsgrad der Nadeln anhand einer Skala von 0 (keine Bräunung), über 1 bis 10 (zehn Prozentschritte der Nadelbräunung) bis 11 (alle Nadeln braun) ermittelt (Johnsen 1989). Die Unterschiede in der Nadelbräunung zwischen den Vollgeschwistern beliefen sich zwischen 0,5 und 1,7 (siehe Tabelle 1). Die biochemischen und physiologischen Ursachen für diese Unterschiede sind bisher nicht bekannt.

In dieser Arbeit sollte geklärt werden, ob sich die Vollgeschwister aus den verschiedenen Kreuzungsumgebungen anhand ihrer physiologischen und biochemischen Reaktionen auf Frost- und Trockenstress unterscheiden lassen (Tabelle 1).

#### 5.1.1 **Reaktion der Nachkommen von Fichte verschiedener Kreuzungsumgebungen auf Froststress**

Die Frostresistenz verschiedener Herkünfte wurde bei Bäumen oder krautigen Pflanzen oft durch Veränderungen der Chlorophyllfluoreszenz und der Elektrolytleitfähigkeit untersucht (Binder und Fielder 1996, Pinhero et al. 1999). Bei der Chlorophyllfluoreszenz wird die photosynthetische Quantenausbeute als der Quotient der variablen Fluoreszenz zur maximalen Fluoreszenz ( $F_v/F_m$ ) gemessen. Sie wurde zur Untersuchung von Anpassung und Stressresistenz der Pflanzen eingesetzt. Während durch die Messung der

Chlorophyllfluoreszenz im Licht, mehr die Anpassungsfähigkeit einer Pflanze abgeschätzt werden kann, weist eine Abnahme der Chlorophyllfluoreszenz an dunkeladaptierten Pflanzen auf irreversible Schäden hin (Maxwell und Johnson 2000). Die Chlorophyllfluoreszenz wurde sofort im Anschluss an den Froststress bzw. im Abstand von 1 bis 14 Tagen gemessen, und damit die Fähigkeit verschiedener Pflanzenarten, sich nach dem Froststress zu erholen, untersucht (Rosse und Haase 2002, Major et al. 2003, Rizza et al. 2001). Außerdem konnten mit Hilfe der Chlorophyllfluoreszenzmessung Folgeschäden in frostgestressten Blättern und Nadeln ausgemacht werden (Lamontagne et al. 2000, Pinhero et al. 1999, Polle et al. 1996)

Die Chlorophyllfluoreszenz wurde sowohl während des Froststresses als auch im Anschluss an den Froststress gemessen. Während des Froststresses sank  $F_v/F_m$  dunkeladaptierter Fichten mit sinkender Temperatur in allen durchgeführten Versuchen (Abbildungen 22, 25 und 26). Es ist davon auszugehen, dass durch die sinkenden Temperaturen bis  $-25\text{ °C}$  alle enzymatischen Prozesse zum Erliegen kamen (Hansen 2000). Gillies und Binder (1996) führten einen sinkenden  $F_v/F_m$ -Wert in dunkeladaptierten Pflanzen auf eine generelle Schädigung des Gewebes durch Eiskristalle und Dehydratisierung zurück. Für die hier durchgeführten Experimente ist diese Erklärung unwahrscheinlich, weil die Reduktion von  $F_v/F_m$  reversibel war. Die photosynthetische Quantenausbeute näherte sich nach dem Ansteigen der Temperatur auf  $2\text{ °C}$  den Werten der Kontrollen an (Abbildungen 22, 25, 26). Hierbei waren alle untersuchten Fichtenlinien zunächst in der Lage, sich von dem Froststress zu erholen.

Nach dem Froststress wurden die Pflanzen im Gewächshaus unter natürlichen Lichtverhältnissen bei  $10\text{ °C}$  weiter beobachtet. Dabei sank  $F_v/F_m$  in allen Experimenten innerhalb von zwei bis sieben Tage nach dem Froststress (Abbildung 23, 25, 26) signifikant unter den Wert der Kontrollen. Tagsüber kommt es zur Lichthemmung am Photosystem II (Öquist und Huner 2003). Bei niedrigen Temperaturen wird kaum Kohlenstoff assimiliert und aufgrund der Wachstumseinstellung im Herbst und Winter werden wenig Kohlenhydrate verbraucht (Grossnickle 2000, Rose und Haase 2002). Dies führt zu einer Anhäufung von Reduktionsäquivalenten am Ende der Lichtreaktion (Rose und Haase 2002). Diese Akkumulation von Reduktionsäquivalenten am Photosystem I führt zu einem verminderten Elektronentransport (Polle 1996). Die am Photosystem II überschüssige Lichtenergie wird über nichtphotosynthetische Löschung als Wärme abgeleitet (Öquist et al. 2001). Eine weitere wichtige Rolle spielte der Violaxanthin-Zeaxanthin-Zyklus (Öquist und Huner 2003). Bei Kiefernarten wurde eine Akkumulation

von Anthocyanin in den Epidermalzellen der Nadeln beobachtet, die als eine Art Lichtfilter das Photosystem II vor Lichthemmung schützten (Huner et al. 1998). Überschüssige Energie in Form von Elektronen kann am Photosystem I auf Sauerstoff übertragen werden, was zu einer Erhöhung der Sauerstoffradikale führt und zur stärkeren Aktivierung des antioxidativen Systems führen kann (Polle et al. 1996). Erst wenn diese Schutzmechanismen überlastet sind und auch die Neubildung des empfindlichen D1-Proteins des Photosystems II nicht schnell genug abläuft, wird das Photosystem II geschädigt und  $F_v/F_m$  nimmt, wie bei diesen Versuchen beobachtet, ab (Öquist et al. 2001). Allerdings war die Kinetik dieser Abnahme insbesondere im Anschluss an den Stress unterschiedlich. In dem im Oktober durchgeführten Froststressexperiment 1 zeigten die Pflanzen, die mit  $-25\text{ °C}$  gestresst wurden und bis zum nächsten Morgen bei  $2\text{ °C}$  in der Kammer blieben, zwei bis drei Wochen nach dem Froststress sinkende  $F_v/F_m$  –Werte (Abbildung 23). Im Frostexperiment 2, das im Februar durchgeführt wurde, sanken die Werte deutlicher in den Samenchargen 15020 und 15021 als in den Samenchargen 15018 und 15019. Dies wies auf eine höhere Schädigung des Photosystems II bei den Vollgeschwistern 15020/15021 als Folge des Froststresses hin (Abbildung 25). Unterschiede in der Schädigung zwischen den einzelnen Geschwisterpaaren sind bei anderen Autoren auch gefunden worden (Skroppa 1991). Die Eltern der Geschwisterpaare 15020/15021 und 15018/15019 stammten aus geographisch naheliegenden Regionen (Skroppa, persönliche Mitteilung). Die Unterschiede der beiden Vollgeschwisterpaare in bezug auf den Froststress sind auf natürliche Variationen zwischen den Herkünften zurückzuführen (Skroppa 1991). Im Froststressexperiment 3, das ebenfalls im Februar durchgeführt wurde, waren  $F_v/F_m$  in allen Linien geringer als in den Kontrollen (Abbildung 26). Möglicherweise wurden durch die längeren Tage Ende Februar, im Gegensatz zum Anfang des Monats, und die konstanten Temperaturen über Null im Gewächshaus bereits eine partielle Enthärtung eingeleitet und damit die Frostempfindlichkeit der Fichten erhöht (Grossnickle 2000). Dafür spricht auch, dass bei manchen Pflanzen im Vorfeld des Froststressexperiments 3 ein Knospenaustrieb beobachtet wurde. Lamontagne et al. (2000) beobachtete, dass Schwarzfichten, die nach dem Froststress bei  $25\text{ °C}$  standen, weniger empfindlich auf Lichthemmung reagierten als solche, die danach bei  $15\text{ °C}$  oder  $5\text{ °C}$  standen. Nach den Froststressexperimenten 2 und 3 befanden sich die Fichten bei  $10\text{ °C}$  im Gewächshaus. Diese Temperatur begünstigte die Lichthemmung in allen Linien gleichermaßen. Die Frostschäden wurden verstärkt, weil enzymatische Reparaturmechanismen nur langsam abliefen. Dies könnte mit ein Grund gewesen sein,

warum die Chlorophyllfluoreszenzen dunkeladaptierter Nadeln 4 bis 8 Tage nach dem Froststress abnehmen.

Die Fichten, die Temperaturen von  $-25\text{ °C}$  ausgesetzt waren, zeigten also im Vergleich zu den Kontrollen anhand der Chlorophyllfluoreszenz Stresssymptome. Doch wie verhielten sich die Nachkommen aus den unterschiedlichen Kreuzungstemperaturen? Der Vergleich der Vollgeschwisterpaare untereinander ergab tendenziell einen Unterschied bei der Chlorophyllfluoreszenz von der Samencharge 15020 (kalt) im Vergleich zur Samencharge 15021 (warm) (Abbildung 25 C, D). Dabei zeigten die Nachkommen aus der warmen Kreuzungsumgebung eine stärkere Verminderung von  $F_v/F_m$  als die Nachkommen aus der kalten Kreuzungsumgebung. Dies deutet auf eine höhere Schädigung der Nachkommen aus der warmen Kreuzungsumgebung hin. Das andere Vollgeschwisterpaar (15018/15019) zeigte untereinander keinen signifikanten Unterschied in der Chlorophyllfluoreszenz nach dem Froststress (Abbildung 25 A, B).

Bei der Elektrolytleitfähigkeitsmessung macht man sich zu nutze, dass durch die mechanische Zerstörung der Membran durch Eiskristalle, Elektrolyte wie Kaliumionen vermehrt ausströmen (Burr et al. 2001). Unter dem Einfluss von Froststress ist die Elektrolytleitfähigkeit frostempfindlicher Pflanzen höher als die frostresistenter Pflanzen (Takac 2004, Gillies und Binder 1996). Der Einfluss der Kreuzungstemperatur auf die Elektrolytleitfähigkeit der Nachkommen war nicht eindeutig. Nur in einem von drei Experimenten war die Elektrolytleitfähigkeit den Samenchargen 15019 und 15021 (warm) bei  $-20\text{ °C}$  signifikant höher als die von den Samenchargen 15018 und 15020 (kalt) (Abbildungen 27 A, B und 28 C, D). Das könnte zumindest auf eine größere Membranschädigung der Nachkommen aus der warmen Kreuzungsumgebung hinweisen, zeigt aber auch, dass andere Faktoren hier überlagernd wirken.

Die Schädigung der Membran kann reversibel sein, so dass nach Auftau- und Reparaturprozessen die integralen Membranproteine (ATPase u. a.) ihre Funktion wieder aufnehmen und die Elektrolyte in die Zelle zurücktransportiert werden können (Sutinen et al. 2001). Damit sinkt die Elektrolytleitfähigkeit bei Temperaturerhöhung wieder, wie hier in den Frostexperimenten 2 und 3 beobachtet. Nach dem Frost können auch Membranschäden infolge des Auftauprozesses entstehen, indem der Protoplast im Zuge der Erwärmung sich nicht mehr in seine ursprüngliche Größe ausdehnen kann, die Ausdehnung des Protoplasten in einer Lysis der Membran endet oder die Plasmamembran sich mit internen Membranen irreversibel verbindet und ihre Funktion nicht mehr ausüben kann (Guy 2003). Membranen können auch durch Sauerstoffradikale geschädigt werden,

die im Zuge der Lichthemmung gebildet werden (Pinhero et al. 1999, Polle et al. 1996). Dies kann sich in einer erneuten Zunahme der Elektrolytleitfähigkeit äußern. Die Zunahme der Elektrolytleitfähigkeit zwischen gestressten Pflanzen und Kontrollen ist bei den Vollgeschwistern 15020/15021 deutlicher als bei den Vollgeschwistern 15018/15019 (Abbildungen 27 und 28), was, wie schon die Chlorophyllfluoreszenz, auf eine höhere Empfindlichkeit der Vollgeschwister 15020/15021 hinweist. Zwischen den Nachkommen aus den verschiedenen temperierten Kreuzungsumgebungen waren die Unterschiede nicht signifikant.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass nur die Vollgeschwister 15020/15021 zeigten, dass die Nachkommen aus einer warmen Kreuzungsumgebung im Trend frostempfindlicher waren als die Nachkommen aus einer kalten Kreuzungsumgebung. Dieses heterogene Ergebnis deckt sich aber auch mit Befunden von Johnson et al. (1996). Diese Autoren zeigten, dass Nachkommen aus kalter und warmer Kreuzungsumgebung je nach Elternpaar variierten. Dies lässt, wie bei anderen Autoren (Andersson 1994, Wulff et al. 1994) die Schlussfolgerung zu, dass nicht jedes Elternpaar auf Umweltveränderungen gleich reagiert und dies in Form von verbesserter Anpasstheit an die Nachkommen weiter gibt. Cullis (2005) führte dies darauf zurück, dass die Reaktion auf Umwelteinflüsse auf genomischer Ebene (DNA-Methylierung/Demethylierung) während des Wachstums und der Reproduktion unter genetischer Kontrolle steht.

Einen Einfluss auf die Ausprägung von maternalen Effekten hat auch die gegenwärtige Umwelt, in der die Nachkommen wachsen (Wulff et al. 1994, Rossiter 1996). Man kann daher vermuten, dass die Ergebnisse von Johnsen et al. (1995, 1996) und die hier gezeigten, nicht direkt vergleichbar sind, denn beide Standorte unterschieden sich unter anderem, aufgrund der geographischen Position, in ihren Lichtbedingungen. Auch wird von Johnsen und Skroppa (1999) betont, dass bei den Nachkommen aus der warmen Kreuzungsumgebung hauptsächlich die Empfindlichkeit gegenüber früh auftretenden Herbstfrösten (September) größer ist. Daher hat möglicherweise der Zeitpunkt der Durchführung der Stressexperimente (Oktober/Februar) das Ergebnis ebenfalls beeinflusst.

### **5.1.2 Reaktion der Nachkommen verschiedener Kreuzungsumgebungen auf Trockenstress**

Trockenheit verursacht auf zellulärem Level ähnliche Effekte wie Frost (Hansen 2000, Sutinen et al. 2001), weil während des Froststresses die im Zellzwischenraum wachsenden Eiskristalle ein Wasserpotentialgefälle zwischen Apoplasten und dem Zellinnenraum



erzeugen. Dieser Gradient verursacht einen Ausstrom des Zellsaftes und führt somit zu einer Dehydrierung der Zelle. Folglich sollten die Samenchargen von Fichten, die geringere Frostschäden aufwiesen auch eine größere Trockentoleranz zeigen (Tabelle 1).

In einem Trockenstressexperiment traten kaum signifikante Unterschiede zwischen den Nachkommen aus der Kreuzung im Gewächshaus (warm) und deren jeweiligen Vollgeschwister aus der Freilandkreuzung (kalt) auf. Die einzige Ausnahme war eine Proteindoppelbande, die in den trockengestressten Proben der Freilandkreuzungen (15872 und 15890) im Vergleich zur Kontrolle nach 14 Tagen stärker war. Diese Doppelbande wurde in den Gewächshauskreuzungen (15869 und 15887) mit deutlicher Verzögerung stärker (Abbildungen 11 A, B). Unterschiede im Bandenmuster von Proteinen nach eindimensionaler Auftrennung wurden auch von Leinhos und Bergmann (1995) bei trockengestresster Gerste gefunden. Dabei waren Proteine mit einem Molekulargewicht von 16, 19 und 24 kDa in den gestressten Geweben neu gebildet worden, während Proteine von 18, 29, 36 und 50 kDa verstärkt gebildet wurden. Leinhos und Bergmann (1995) spekulierten hier, ob es sich dabei unter anderem um Dehydrine handeln könnte. Die Dehydrine gehören zu der Gruppe der Lea-Proteine (late embryogenesis abundant proteins), deren Bildung durch Abscisinsäure (ABA) induziert wird und die eine wichtige Rolle in der Proteinstabilisierung bei Wasserverlust der Zelle einnehmen (Close 1996, Allagulova et al. 2003). Ihre Größe variiert zwischen 9 und 200 kDa. In der Weisfichte wurde die Akkumulation von Transkripten eines Dehydrins während des Trockenstresses nachgewiesen (Richard et al. 2000). Da die Proteinbanden der Geschwisterpaare (15869/15872, 15887/15890) nicht weiter analysiert wurden, kann auch hier spekuliert werden, ob die frostresistenteren Samenchargen 15872 und 15890 in Anpassung an die Trockenheit schneller Dehydrine bilden als die Vollgeschwister 15869 und 15887.

Auch in einem weiteren Experiment mit dem Vollgeschwisterpaar 15044 (kalt) und 15046 (warm) konnten nur wenige Unterschiede in der Reaktion auf den Trockenstress festgestellt werden, obwohl nach dem Froststress die Fichten der Samencharge 15046 (5,5) wesentlich stärker geschädigt waren als die der Samencharge 15044 (3,8). Da während des gesamten Versuches die Wasserpotentiale der gestressten Pflanzen nur gering unter die Werte der Kontrolle sanken (Abbildung 12 E, F) und der relative Wassergehalt sich nur in den Wurzeln signifikant zur Kontrolle änderte (Abbildung 13 E, F), ist hier von einem milden Trockenstress auszugehen. Bei Fichten wurde bereits unter mildem Trockenstress eine Beeinträchtigung der Kohlenstofffixierung beobachtet, die sich durch eine signifikante Abnahme der stomatären Leitfähigkeit und eine Reduktion der Nettphotosynthese äußert

(Tausz 2001, Grossnickle 2000, Kronfuss et al 1998). Dies führt vermutlich zu einer Anhäufung von Reduktionsäquivalenten (NADPH) und somit zu einer Einschränkung des Elektronentransports, was wiederum zu einer Schädigung des Photosystems II durch Licht führen kann (Dreyer 1997, Chaves et al. 2003). Um dies zu vermeiden, wird die überschüssige Energie am Photosystem II in Form von Wärme abgeleitet oder kann am Photosystem I auf Sauerstoff übertragen werden. Die dabei entstehenden reaktiven Sauerstoffspezies werden über das antioxidative System abgebaut (Baker und Rosenquist 2004, Polle 1996). Bei diesen Vorgängen sinkt die photochemische Effizienz des Photosystems II ( $\Phi_{II}$ ). Man spricht von einer Herunterregulation des Photosystems II im Licht. Das System erholt sich im Dunkeln wieder, solange die im vorangegangenen beschriebenen Schutzmechanismen und weitere Reparaturmechanismen der Zelle greifen (Öquist und Huner 2003).

Der  $\Phi_{II}$ -Wert sinkt in den Fichten der Samencharge 15044 (kalt) eher als in denen der Samencharge 15046 (warm). Dies könnte auf eine schnelleres Herunterregulieren des Photosystems II als Schutz gegen zu viel Licht in den Nachkommen aus der Freilandkreuzung (15044) hindeuten (Abbildung 12 A, B). Auch die maximale photosynthetische Effizienz ( $F_v/F_m$ ) nahm in der Samencharge 15044 zeitlich eher signifikant im Vergleich zur Kontrolle ab als bei der Samencharge 15046 (Abbildung 12 C, D). Dies könnte im ersten Moment auf eine Schädigung des Photosystems II hindeuten (Maxwell und Johnson 2000). Die Ergebnisse der maximalen photosynthetischen Effizienz ( $F_v/F_m$ ) standen aber im Widerspruch zu den gemessenen Wasserpotentialen und dem relativen Wassergehalt in den Nadeln. Da  $F_v/F_m$  nach der Abnahme konstant auf gleichem Niveau blieb, wird auch hier eine Anpassung der Aktivität des Photosystems II an den Trockenstress vermutet (Giardi et al. 1996). Giardi et al. (1996) beobachteten bei Erbse unter Trockenheit eine Reduktion der vorhandenen Photosysteme II Kernkomplexe und eine Reorganisation der restlichen Photosysteme II Kernkomplexe über Phosphorylierung und Dephosphorylierung der einzelnen Proteine als Anpassung an den Stress.

Die Ergebnisse der zweidimensionalen Elektrophorese ergaben, dass in den Vollgeschwistern 15044 (kalt) und 15046 (warm) nach 14 Tagen Trockenstress Proteine des sauerstoffentwickelnden Komplexes (Oxygen evolving complex) im Vergleich zur Kontrolle stärker waren. Dieser Komplex setzt sich aus Proteinen und Manganionen zusammen und ist für die Oxidation von Wasser zu Sauerstoff, Protonen und Elektronen verantwortlich (Ghanotakis 1990). Die wesentlichen Proteine dieses Komplexes sind OEE 1 (33 kDa), OEE 2 (23 kDa) und OEE 3 (18 kDa). Diese Proteine sind kerncodiert und

müssen in den Chloroplasten transportiert werden. De Vitry et al. (1989) fand bei *Chlamydomonas reinhardtii* am Photosystem II sowohl eine eigene Bindungsstelle für das OEE2-Protein als auch eine für das OEE1-Protein. In höheren Pflanzen hat scheinbar nur das OEE1-Protein eine Bindungsstelle am Photosystem II-Kernkomplex (Miyao und Murata 1989), während sich das OEE2-Protein bzw. das OEE3-Protein nacheinander an das OEE1-Protein anlagern. Sowohl OEE1 als auch OEE2 scheinen für die Stabilität des Photosystems II Kern-Komplexes wichtig zu sein (Minagawa und Takahashi 2004). Versuche mit Mutanten, die entweder das OEE1-Protein oder das OEE2-Protein nicht bilden konnten, zeigten eine reduzierte Sauerstoffbildung (de Vitry et al. 1989, Ghanotakis 1990). Eastman et al. (1997) beobachteten bei Fichten unter heftigen Trockenstress (- 3,5 MPa), dass das OEE2-Protein vom Photosystem II dissoziierte. Die verstärkte Bildung der Proteine des sauerstoffbildenden Apparates im aktuellen Versuch (Tabelle 10) deuten darauf hin, dass das OEE2-Protein unter mildem Trockenstress vom Photosystem II weg diffundiert und dann über eine verstärkte Neubildung ersetzt werden muss. Das gleiche könnte auf OEE1 zutreffen. Eastman et al. (1997) schlossen nicht aus, dass nach Verlust des OEE2-Proteins auch das OEE1-Protein sich vom Photosystem II Komplex lösen könnte. Kaminska-Rozek und Pukacki (2004) beobachteten bei Fichten unter mildem Trockenstress eine Schädigung der Membran anhand einer erhöhten Elektrolytleitfähigkeit und eines Anstiegs von Malondialdehyd. Dies könnte auch die Thylakoidmembran betreffen und so eine Abspaltung des sauerstoffbildenden Komplexes vom Photosystem II begünstigen. Eine erhöhte Expression des OEE2-Proteins wurde in Tabak nach biotischem Stress (Rahoutei et al. 2000, Perez-Bueno et al. 2004), in Arabidopsis unter erhöhtem CO<sub>2</sub> (Bae und Sicher 2004) und in Reis nach Schwermetallstress (Hajduch et al. 2001) beobachtet.

Eine eingehendere Untersuchung von Kontrollen und trockengestressten Fichten der Samencharge 15044 mittels 2D-Elektrophorese ergab des weiteren Veränderungen in einem unbekanntem Protein und der großen Untereinheit von Ribulose-1,5-bisphosphat Carboxylase/Oxygenase (Rubisco LS). Es wurde beobachtet, dass ein Rubisco LS zugeordneter Spot nach Trockenstress stärker war und ein weiterer neu hinzukam (siehe Tabelle 10). Es könnte sich hierbei um Fragmente von Rubisco LS handeln, denn auch Hajheidari et al. (2005) fand eine erhöhte Fragmentationsrate von Rubisco LS in Zuckerrübe, wenn der Wassergehalt in den Blättern gegenüber der Kontrolle um 15 % vermindert war. Costa et al. (1998) beobachtete ebenfalls das vermehrte Auftreten von Rubisco LS Fragmenten bei Strandkiefern, die einem Wasserpotential von -2 MPa

ausgesetzt waren. In beiden Publikationen wurde vermutet, dass die Rubisco LS durch reaktiven Sauerstoff geschädigt wird. Das geschädigte Enzym wird funktionsuntüchtig und abgebaut. Watkinson et al. (2003) fanden unter mildem Trockenstress in Loblolly Kiefer eine unveränderte Transskriptionsrate von Ribulose-1,5-bisphosphat Carboxylase/Oxygenase (Rubisco), gleichzeitig aber eine verminderte Photosyntheserate. Flexas et al. (2004) zeigten, dass unter mildem Trockenstress kaum Veränderungen der Rubisco-Aktivität an sich auftraten. Dafür zeigten einige Enzyme, die in der Regeneration von Ribulose-1,5-bisphosphat involviert waren, unter mildem Trockenstress sofort eine Abnahme der Aktivität (Flexas et al. 2004). Wenn nun aber weniger Ribulose-1,5-bisphosphat als Substrat für Rubisco vorhanden ist und gleichzeitig aufgrund des Schließens der Stomata auch weniger CO<sub>2</sub>, könnte überschüssige Rubisco in ihre Untereinheiten zerfallen bzw. abgebaut werden und somit die vermehrten Fragmente der großen Untereinheit bei den trockengestressten Fichten erklären (Tabelle 10). Der Anteil der Ribulose-1,5-bisphosphat Carboxylase/Oxygenase an löslichen Proteinen eines Blattes macht 50 % aus (Nultsch 1991). Dies könnte erklären, warum kaum Veränderungen in der Aktivität der Rubisco trotz Abbau unter mildem Trockenstress bei anderen Autoren auszumachen waren.

Alle diese Veränderungen auf Proteinebene wurden beobachtet, obwohl nach 14 Tagen Trockenstress keine signifikanten Unterschiede im Wasserpotential des Sprosses oder im Wassergehalt von Wurzeln und Nadeln gab. Tausz et al. (2001) hatten ähnliche Beobachtungen bei trockengestresster *Pinus canariensis* gemacht. Dabei war auch das Wasserpotential der gestressten Pflanzen ( $-0,40 \pm 0,11$  MPa) nicht signifikant von dem der Kontrollen ( $0,44 \pm 0,22$  MPa) verschieden. Dennoch fanden Tausz et al. (2001) einen erhöhten Anteil an reduziertem Glutathion am Gesamtglutathionpool und werteten dies als frühen, biochemischen Stressindikator.

Somit könnten sich die Nachkommen aus der kalten Kreuzungsumgebung (15044) über das Herunterregulieren des Photosystems II - Aktivität im Licht und im Dunkeln und die vermehrte Neubildung von Proteinen des sauerstoffbildenden Apparates als Ausgleich zu den vermehrten Verlusten durch Abspaltung bzw. Abbau möglicherweise besser an den Trockenstress angepasst haben als die Nachkommen aus der warmen Kreuzungsumgebung (15046). Ein Indiz dafür ist, dass am Ende des Versuches die Biomasse der Fichten der Samencharge 15044 von denen der Kontrollen nicht signifikant verschieden war. Im Gegensatz dazu war bei den Fichten der Samencharge 15046 die Biomasse von den trockengestressten Pflanzen signifikant geringer als die der Kontrollen (Abbildung 14).

### 5.1.3 Einfluss der Kreuzungsumgebung auf das Proteinmuster

Bei den Kreuzungslinien 15044 (kalt) und 15046 (warm) wies Baumann (2004) Unterschiede in der Gesamt-DNA-Methylierung nach. Dabei war die Gesamt-DNA bei den Nachkommen aus der warmen Kreuzungsumgebung mit  $28 \pm 1,5$  % deutlich stärker methyliert als bei den Nachkommen aus der kalten Kreuzungsumgebung mit  $13 \pm 1$  % (Baumann 2004). Unterschiede in der Methylierung der DNA können zu Unterschieden in der Genexpression und damit zu Unterschieden auf Proteinebene führen (Kaliz und Purugganan 2004, Finnegan et al. 2000). Bei den untersuchten Linien 15044 und 15046 kann ein solcher Bezug vermutet werden. Nadelproben der Nachkommen aus der kalten Kreuzungsumgebung enthielten im Vergleich zu den Nachkommen aus der warmen Kreuzungsumgebung eine zusätzliche Proteingruppe (Abbildungen 20 und 21). Diese Proteine (MW 26-29 kDa, pI 6,5-7,5) konnten leider nicht genauer klassifiziert werden, da sie sich aufgrund ihrer geringen Abundanz nicht mit Coomassie-Blau anfärben ließen und somit nicht der ESI-LC-MS zugänglich waren. David et al. (1997) fanden zum Teil Unterschiede im Proteinmuster bei Weizen, der ,von gleichen Ursprungsarten ausgehend, an verschiedenen Orten in Frankreich über 8 Jahre kultiviert wurde. Die Autoren führten diese Unterschiede auf die Adaptation an die verschiedenen Bedingungen vor Ort zurück. Baumann (2004) fand auch bei einem weiteren Geschwisterpaar von Fichte, dass die DNA der Nachkommen aus der kalten Kreuzungsumgebung weniger methyliert war als bei den Nachkommen aus der warmen Kreuzungsumgebung. Dennoch müssen mehr Vollgeschwistern analysiert werden, um zu sehen, ob sich dieses Ergebnis weiterhin wiederholen lässt. Auch muss geprüft werden, ob der Methylierungsgrad, wie hier gezeigt, jedes mal Auswirkungen auf das Proteinspektrum hat, da das Fichtengenom zu 75 % aus nichtcodierenden repetitiven DNA-Sequenzen besteht (Dhillon 1987), die auch unterschiedlich methyliert sein können.

### 5.1.4 Trockenstress bei zwei unterschiedlich frostresistenten Fichtenherkünften

Wie schon weiter oben berichtet, verursacht Frost durch Eiskristallbildung ebenso eine Dehydrierung der Zelle wie Trockenheit. Deshalb ist die Zellantwort unter anderem durch die Bildung von LEA-Proteinen ähnlich (Bray 1997, Thomashaw 1999, Pearce 1999, Wang et al. 2003). Es gibt Hinweise darauf, dass es zu einer Überschneidung der Signalwege von Trockenheit und Frost/Kälte gibt (Shinozaki et al. 2003, Yamaguchi-Shinozaki et al. 2002). Bei Kartoffeln konnte beobachtet werden, dass die frostresistentere Art auch die trockenresistentere war (Martinez et al. 2001). Für Bäume ist die Frage

ebenfalls von besonderem Interesse, in wie weit Frostresistenz auch mit erhöhter Trockenresistenz einhergeht. Um diese Frage zu beantworten, wurde das Vollgeschwisterpaar 15872 und 15869 zu der Herkunft 1 und das Vollgeschwisterpaar 15887 und 15890 zu der Herkunft 2 zusammengefasst und deren Stressreaktionen untersucht. Ausgangspunkt war dabei, dass die Herkunft 1 frostempfindlicher war als die Herkunft 2 (siehe Tabelle 1). Blödner et al. (2005) zeigten, dass die Herkunft 1 trockenempfindlicher war als die Herkunft 2. Die Herkunft 1 zeigte eine schnellere Schädigung des Photosystems II und einen größeren Wasserverlust in Nadeln, Stamm und Wurzeln als Herkunft 2 (Abbildungen 7 und 8). Diese stärkere Beeinträchtigung der Pflanzen der Herkunft 1 führte zu einer signifikanten Reduktion der Gesamttrockenmasse am Ende des Trockenstresses (Abbildung 9). Das heißt die frostresistentere Herkunft 2 war auch die trockenresistentere Herkunft.

Generell scheinen Guajakolperoxiase- (POD) und Superoxiddismutaseaktivitäten (SOD) bei Stressanpassung eine Rolle zu spielen. Jedoch zeigten die Enzymaktivitäten von POD- und SOD zwischen den gestressten Pflanzen und den jeweiligen Kontrollen keine Unterschiede in beiden Herkünften (Abbildung 10 C/D, E/F). Schwanz und Polle (2001) fanden dagegen eine Abnahme der SOD-Aktivität bei *Pinus radiata* unter Trockenstress. Dies korrelierte mit einer erhöhten Lipidoxidation. Alonso et al. (2001) fand einerseits eine Abnahme der KCN-resistenten SOD-Aktivität in einjährigen Nadeln in *Pinus halpensis*, welche auf eine Schädigung der SOD hinwies. Andererseits fanden die selben Autoren eine Zunahme der CuZn-SOD-Aktivität in den diesjährigen Nadeln nach Trockenstress in *Pinus halpensis* und vermuteten eine Aktivierung des antioxidativen Systems gegen ein stärkeres Aufkommen von Sauerstoffradikalen. In dem vorliegenden Trockenstressexperiment bei Fichte wurden zum einen Nadeln aller Jahrgänge gemischt, zu anderen wurde nicht zwischen den verschiedenen SOD Enzymarten (Cu/Zn SOD, MnSOD, FeSOD) unterschieden. Insgesamt war bei *Picea abies* die Aktivität der SOD in der Herkunft 2 signifikant höher als in der Herkunft 1 (Abbildung 10 E, F). Diese höhere SOD-Aktivität könnte ein Grund sein, warum in Familie 2 Trockenstressschäden später auftraten. Transgene Luzerne, in der die Superoxiddismutase überexprimiert war, besaß eine erhöhte Resistenz gegen Trockenheit und Frost (Mc Kersie et al. 2000, Rubio et al. 2002). Dies konnte bei Baumwolle (*Gossypium hirsutum*) und Pappel (*Populus termula x Populus alba*), die Kälte und/oder hohen Lichtintensitäten ausgesetzt waren, nicht bestätigt werden (Pyaton et al. 1997, Tyystjärvi et al. 1999). Diese gegensätzlichen Ergebnisse bei

den verschiedenen Spezies zeigen, das es noch andere Mechanismen geben muss, aufgrund derer die Fichtenherkunft 2 sowohl trockenresistenter als auch frostresistenter war.

## **5.2 *Arabidopsis thaliana* (Ackerschmalwand)**

*Arabidopsis thaliana* wurde hier als Modellorganismus verwendet, um den Einfluss der Kreuzungstemperatur auf die Nachkommenschaft genauer zu untersuchen. Genetiker konzentrierten sich beim genomischen Imprinting mehr auf molekularbiologische/genetische Aspekte und nutzten dabei oft *Arabidopsis* als Modellpflanze (Adams et al. 2000, Gehring et al. 2004), während sich ökologisch orientierte Wissenschaftler bei der Untersuchung des maternalen/parentalen Effektes mehr auf physiologische Parameter konzentrierten und weniger mit *Arabidopsis* arbeiteten (Andalo et al. 1998, Andalo et al. 1999, Munir et al. 2001). In dieser Arbeit wurde versucht, beide vorher genannten Betrachtungsweisen zusammenzubringen. So sollte anhand ökophysiologischer Parameter, biochemischer Analysen und molekularbiologischer Methoden der Einfluss der Kreuzungstemperatur (15 °C/ 25 °C) auf die Nachkommenschaft bei *Arabidopsis* untersucht werden. Eine Gesamtbetrachtung dieser Art wurde bisher, bis auf Johnsen et al. (2005) mit Fichte, nicht durchgeführt.

### **5.2.1 Einfluss der Kreuzungsumgebung auf den Nährstoffgehalt beim Samen**

Da sich die parental Effekte als erstes auf das Samengewicht auswirken (Wulff 1995, Galloway 2001 a), wurden auch in dieser Arbeit die Samen gewogen. Das Gewicht der Samen aus der warmen Kreuzungsumgebung (25 °C) war größer als das der Samen aus der kalten Kreuzungsumgebung (15 °C). Andalo et al. (1999) dagegen beobachtete, dass *Arabidopsis* in warmer Kreuzungsumgebung (22,4 °C) relative kleine Samen produzierten. Dafür war bei Andalo et al. (1999) das Gesamtgewicht der Samen pro Pflanze in warmer Kreuzungsumgebung (22,4 °C) größer als das Gesamtgewicht der Samen aus der kalten Kreuzungsumgebung (9, 1 °C). Auch Johnsen und Ostreng (1994) fanden ein größeres Gewicht bei Fichtensamen aus der wärmeren Kreuzungsumgebung. Im Gegensatz dazu beobachteten Gray et al. (1998) bei Karotte (*Daucus carota*), Charest und Potvin (1993) bei Hühnerhirse (*Echinochloa crus-galli*), Lacey (1996) bei Spitzwegerich (*Plantago lanceolata*) und Wulff (1986 a, b) bei *Desmodium paniculatum* ein höheres Samengewicht unter kalter Kreuzungstemperatur.

Clapham et al. (2000) führte das höhere Samengewicht bei Lupine bei 13 °C Umgebungstemperatur im Gegensatz zu 28 °C auf eine vorzeitige Blattseneszenz bei der

höheren Temperatur zurück. Potvin und Charest (1991) gingen davon aus, dass unter höheren Temperaturen aufgrund von gesteigerter Respiration weniger Kohlenhydrate in den Blättern vorhanden sind, die später in die reifenden Samen transportiert werden konnten. Eine Analyse der Kohlenhydrate in den Arabidopsissamen aus warmer (25 °C) und kalter (15 °C) Kreuzungsumgebung ergab tatsächlich einen höheren Anteil an löslichen Kohlenhydraten bei dem Samen aus der kalten Kreuzungsumgebung (Tabelle 13). Allerdings war der Anteil an Glucose, Fructose und Stärke zwischen den beiden Kreuzungsumgebungen nicht signifikant verschieden. Da der Gesamtkohlenstoff in den Samen aus 15 °C etwas größer als im Samen aus 25 °C war, müssen demnach die Kohlenhydrate in einer anderen Form als Glucose, Fructose oder Stärke vorliegen. Der Anteil der Kohlenhydrate bzw. des Kohlenstoffes war nicht der Grund, warum die Samen aus der warmen Kreuzungsumgebung mehr wogen als die Samen aus der kalten Kreuzungsumgebung.

Der Anteil an Stickstoff war im Gegensatz zum Kohlenstoff in den Samen aus der warmen Kreuzungsumgebung größer als in den Samen aus der kalten Kreuzungsumgebung. Der höhere Stickstoffanteil führte damit zu einem geringeren C/N-Verhältnis in den Samen aus der warmen Kreuzungsumgebung. Andalo et al. (1999) fanden bei Arabidopsissamen, die unter höheren Temperaturen und höheren Lichtintensitäten gebildet wurden, ebenfalls einen etwas größeren Stickstoffanteil als bei Samen aus niedrigeren Temperaturen und Lichtintensitäten. Da Stickstoff im Samen hauptsächlich in Form von Proteinen gespeichert wird, lässt das auf einen größeren Proteinanteil in den Arabidopsissamen aus der 25 °C warmen Kreuzungsumgebung schließen. Gray et al. (1988) fanden in Karottensamen aus warmer Kreuzungsumgebung ebenfalls den höheren Stickstoffanteil. Charest und Potvin (1993) fanden bei Samen der Hühnerhirse aus der kalten Kreuzungsumgebung, die größer waren als die aus warmer Kreuzungsumgebung, den höheren Stickstoffanteil. Auch unter dem Einfluss anderer Umweltbedingungen (gesteigertes CO<sub>2</sub> in der Luft) wurden Veränderungen beim C/N-Verhältnis des Samens festgestellt (Andalo et al. 1998). Wulff (1995) schlug als Erklärung für die Veränderung des C/N-Verhältnisses vor, dass je länger die Samenproduktionsperiode dauert, die Samen aufgrund von sinkendem Nährstoffangebot, kleiner werden. Hier ist kurz einzufügen, dass die Mutterpflanzen wie unter 2.2 beschrieben zunächst unter 20 °C angezogen wurden, um eine ausreichende Rosettenbildung zu gewährleisten. Erst ab der Blütenbildung bzw. Blühinduktion wurden die Temperaturen in den Klimakammern auf 15 °C und 25 °C umgestellt. Die Arabidopsispflanzen hatten somit die gleiche Ausgangsposition. Lacey



(1996) hatte ein ähnliches Vorgehen mit Spitzwegerich beschrieben und festgestellt, dass umweltbeeinflusste parentale Effekte in dem Zeitraum zwischen Gametenbildung bis zur Samenreife wirkten. Die Arabidopsispflanzen in der 15 °C kalten Kreuzungsumgebung blühten ein bis zwei Wochen später, und der Samen war erst zwei bis drei Wochen später reif als bei den Pflanzen bei 25 °C. Somit wurde wahrscheinlich, wie von Wulff (1995) vermutet, der Stickstoff aus dem Boden über diesen längeren Zeitraum innerhalb der Pflanzen bei 15 °C anderweitig verbraucht und anteilmäßig weniger in die Samen transportiert. Eine andere Möglichkeit ist die, dass der Stickstoff aufgrund der kälteren Temperatur (15 °C) vermindert aufgenommen wurde. Der höhere Stickstoffanteil und damit der höhere Proteinanteil könnte somit das höhere Gewicht beim Samen aus der warmen Kreuzungsumgebung bewirkt haben.

Die Umgebungstemperatur hatte außerdem einen Einfluss auf die Zusammensetzung der Fettsäuren bei den Arabidopsisamen. Die Summe aller Fettsäuren war in den Samen aus der kalten Kreuzungsumgebung höher als in dem Samen aus der warmen Kreuzungsumgebung (Tabelle 14). Pritchard et al. (2000) fanden ähnliche Ergebnisse bei Raps. Die Autoren gingen davon aus, dass unter kälteren Temperaturen der Samen einem längeren Reifeprozess unterliegt und so mehr Fettsäuren eingelagert werden können. Der Anteil der Ölsäure war in den Samen aus der warmen Kreuzungsumgebung höher als in den Samen aus der kalten Kreuzungsumgebung. Pritchard et al. (1999 und 2000) fanden bei der Rapsorte Canola (*Brassica napus* L.) ebenfalls einen höheren Anteil an Ölsäure und Proteinen im Samen, wenn die Pflanzen im Frühjahr zur Blüte und Samenreife wärmeren Temperaturen ausgesetzt waren. Der Anteil an Palmitinsäure, Stearinsäure, alpha-Linolensäure, Arachinsäure oder Erucasäure war dagegen in den Samen aus der kalten Kreuzungsumgebung höher als im Samen aus der warmen Kreuzungsumgebung. Deng und Scarth (1998) fanden bei Raps, dass sich unter hohen Temperaturen der Anteil der Ölsäure (18:1) erhöhte und im Gegenzug der Anteil an Linolensäure (18:3) erniedrigte. Bei kälteren Temperaturen war das Verhältnis umgekehrt. Dies wurde auch bei Arabidopsis beobachtet (Tabelle 14). Sowohl Deng und Scarth (1998) also auch Pritchard et al. (2000) vermuteten, dass durch den zeitlich schnellen Reifungsprozess im Warmen die einfachgesättigte Ölsäure nicht in die mehrfach ungesättigte Linolensäure umgesetzt werden kann, oder dass die dafür zuständigen Desaturasen aufgrund ihrer Temperaturempfindlichkeit gehemmt sein könnten. Die verallgemeinerte Aussage, dass unter niedrigeren Temperaturen der Anteil an ungesättigten Fettsäuren im Samen zunimmt (Canvin 1965), kann also in bezug auf die Hauptfettsäuren der Arabidopsisamen: Ölsäure

→ Linolsäure → Linolensäure bestätigt werden. In der Gesamtbetrachtung dagegen war bei Samen aus der kalten Kreuzungsumgebung der prozentuale Anteil der gesättigten Fettsäuren an der Gesamtsumme höher und der Anteil der ungesättigten etwas niedriger als bei Samen aus der warmen Kreuzungsumgebung. Da diese Gesamtbetrachtung auch Fettsäuren mit geringer Konzentration beinhaltet, bleibt die Frage offen, ob diese Fettsäuren einen Einfluss auf die Keimung der Samen und weitere Entwicklung der Pflanzen hätten. Abschließend betrachtet waren die Fettsäurekonzentrationen auch nicht die Ursache, warum der Samen aus der warmen Kreuzungsumgebung schwerer war als der Samen aus der kalten Kreuzungsumgebung.

Möglich wäre, dass ein größerer Embryo das höhere Gewicht des Samens bei 25 °C bewirkte. Gray et al. (1988) fanden bei Karotte eine Zunahme der Länge des Embryos in dem Samen aus der warmen Kreuzungsumgebung (23 °C), zeigte aber auch, dass das Gewicht der Samenhülle bei dem Gesamtgewicht des Samens eine Rolle spielte.

### **5.2.2 Einfluss der Kreuzungsumgebung auf Keimung und Wachstum**

Die Arabidopsissamen aus der warmen Kreuzungsumgebung keimten bei 20 °C 24 Stunden eher als die Samen aus der kalten Kreuzungsumgebung (Abbildung 29). Lacey et al. (2003) fanden ebenfalls einen 24-stündigen Unterschied zwischen warmer und kalter Kreuzungsumgebung bei Spitzwegerich (*Plantago lanceolata*). Die Autoren sahen in der schnelleren Keimung einen Vorteil im schnelleren Erschließen von Ressourcen und der schnelleren Besiedlung von neuen Gebieten. Allgemein werden Keimschnelligkeit und Keimfähigkeit als Merkmale höherer Fitness angesehen (Galloway 2001 b, Donohue und Schmitt 1998). Die Keimschnelligkeit scheint von der Dicke der Samenhülle abhängig zu sein (Lacey et al. 1997). Je dicker die Samenhülle ist, um so langsamer keimt der Samen. Demnach kann vermutet werden, dass die Arabidopsissamen aus der warmen Kreuzungsumgebung eine dünnere Samenhülle hatten. Des Weiteren kann ein höherer Stickstoffanteil die Keimung beschleunigen (Gray et al. 1988), was für die Samen aus der warmen Kreuzungsumgebung zutreffen würde. Auch wurde gefunden, dass der Embryo selbst oder sein Hormongehalt die Keimung beeinflussen können (Gutterman 1992).

Charest und Potvin (1993) erhielten bei Hühnerhirse in der kalten Kreuzungsumgebung schwerere Samen als in der warmen Kreuzungsumgebung. Wenn die Samen in unterschiedlichen Temperaturumgebungen keimten, keimten immer die schwereren Samen schneller und zu einem höheren Prozentsatz. Bei den Arabidopsispflanzen in dieser Arbeit

keimten ebenfalls die schwereren Samen aus der warmen Kreuzungsumgebung etwas schneller als die aus der kalten Kreuzungsumgebung. Dies war allerdings nur der Fall, wenn die Keimung unter Temperaturen von 10 °C bis 20 °C beobachtet wurde. Bei Temperaturen von 25 °C und 30 °C keimten die Samen gleichschnell. Die prozentuale Keimfähigkeit aller Samen war ähnlich. Offenbar hatte die aktuelle Umgebungstemperatur auch einen Einfluss auf das Keimungsverhalten der Nachkommen.

Der Vorsprung aus der schnelleren Keimung setzte sich bei den Arabidopsis im Blattzuwachs fort, so dass am Ende die Nachkommen aus der wärmeren Kreuzungsumgebung in den meisten Versuchen die höhere Blattanzahl und das höhere Blattfrischgewicht hatten (Abbildungen 30 und 31). Noch deutlicher war der Einfluss der Umgebungstemperatur beim Wurzelwachstum. Selbst bei den niedrigeren Temperaturen, wo ein Vorteil der Pflanzen aus der kalten Kreuzungsumgebung erwartet wurde, wuchsen die Wurzeln der Nachkommen aus der warmen Kreuzungsumgebung deutlich schneller (Abbildung 32). Andalo et al. (1999) konnten dagegen bei Arabidopsis keine großen Unterschiede zwischen den Nachkommen aus unterschiedlich temperierten Kreuzungsumgebungen (9,1 °C/22,4 °C) hinsichtlich des Wachstums beobachten. Dennoch wurde oft gezeigt, dass die größeren Samen auch die größeren Pflanzen hervorbringen, z. B. bei Spitzwegerich (*Plantago lanceolata*), *Desmodium paniculatum* oder Lupine (*lupinus albus* L.) (Clapham et al. 2000, Lacey 1996, Wulff 1986 a, b). Begründet wurde das schnellere Wachstum von Blättern und Wurzeln mit dem größeren Anteil an Reservestoffen im Samen (Wulff 1995). In dieser Form können die parental Effekte noch lange auf die sich entwickelnde Pflanzen nachwirken. Proteine und Ölsäure waren offenbar die einzigen Reservestoffe, die bei dem Samen aus der warmen Kreuzungsumgebung im Vergleich zum Samen aus der kalten Kreuzungsumgebung in größerer Menge vorhanden waren. Schweizer und Ries (1969) konnten zeigen, dass Hafersamen mit dem größeren Proteingehalt auch die größeren Pflanzen hervorbrachten. Bis hierher kann festgehalten werden, dass die maternalen/parentalen Effekte in erster Linie Einfluss auf den Gehalt an Reservestoffen im Samen hatten. Roach und Wulff (1987) bezeichneten die Einflüsse auf Nährstoffgehalt im Samen und die Embryogröße als umweltbedingte maternale Effekte und grenzten diese von den genetisch bedingten maternalen Effekten ab.

### **5.2.3 Unterschiede in der Kältestressreaktion und in der Genexpression zwischen den Nachkommen aus den unterschiedlichen Kreuzungsumwelten**

Wie schon gesagt, wurde in der Literatur bisher hauptsächlich gezeigt, dass parentale Effekte oft über die Samen und deren Reservestoffe wirken und daher zunächst Dormanz, Keimung und die ersten Entwicklungsstadien beeinflussen. Dann werden die elterlichen Einflüsse schwächer oder verschwinden ganz (Adler und Kittelson 2004). Andere Theorien gehen von einem Einfluss der Temperatur auf die sich bildenden Gameten oder direkt auf den sich entwickelnden Embryo aus (Lacey 1996). Dabei wird die Genexpression durch Methylierung von DNA variiert (Johnsen et al. 2005). Man spricht dann von epigenetischen Einflüssen und vom Epigenom als der Summe aus Chromatinstrukturen und dem DNA-Methylierungsmuster, das ein Resultat aus der Interaktion des Genoms mit der Umwelt ist (Levenson und Sweatt 2005).

In der vorliegenden Arbeit wurde auch der Methylierungsgrad der Gesamt-DNA in ausgereiften Arabidopsispflanzen untersucht. Dazu wurde aus Blättern von Nachkommen aus warmer (25 °C) und kalter (15 °C) Kreuzungsumgebung DNA isoliert und von Herrn Baumann (Technische Universität München) analysiert. Es konnten keine signifikanten Unterschiede im Methylierungsgrad zwischen den Nachkommen aus den verschiedenen Kreuzungsumgebungen gefunden werden (Baumann 2004). Allerdings ist das Genom von Arabidopsis mit 125 Megabasenpaaren wesentlich kleiner als das von Fichte mit 1,5-3 x 10<sup>10</sup> Basenpaaren und enthält auch weniger nichtcodierende Regionen, so dass Unterschiede in der Methylierung weniger auffallen würden. Bei Arabidopsis wurden Unterschiede im Methylierungsgrad durch Umweltfaktoren (Licht, Temperatur) beobachtet, die die Blühinduktion bei den Pflanzen beeinflussten (Finnegan et al. 1998). In wie weit diese Veränderung an die Nachkommen weitergegeben werden, wurde nicht untersucht (Baumann 2004). Zudem änderte sich der Methylierungsgrad der DNA mit dem Entwicklungsstadium der Pflanze (Richards 1997, Finnegan et al. 2000). Es könnte sein, dass zu einem früheren Erntezeitpunkt, Unterschiede in der DNA-Methylierung gefunden worden wären, z.B. bei den ersten Keimungs- und Entwicklungsstadien. Mit dem Alter der Pflanze kommt immer mehr der Genotyp der Nachkommen zum Tragen und der Einfluss der Umwelt, in der die Nachkommen wachsen (Galloway 2001 b, Munir et al. 2001).

Bei einem Geschwisterpaar von Fichte konnten zwischen den verschiedenen Kreuzungsumgebungen Unterschiede in der DNA-Methylierung und im Proteinmuster nach der 2 D - Elektrophorese gefunden werden (siehe 3.1.2 und 5.1.3). Bei Arabidopsis konnten weder bei der DNA-Methylierung noch im globalen Proteinmuster signifikante

Unterschiede ausgemacht werden (Abbildungen 33 und 34). Aufgrund der Größe des Genoms konnten kleine Veränderungen im Methylierungsgrad schlechter gemessen werden (Baumann 2004). Eventuelle Auswirkungen auf das Proteinmuster wären vielleicht mit Hilfe eines Computerauswertungsprogramms zu erkennen gewesen.

Um zu überprüfen, ob sich trotz gleichen DNA-Methylierungsgrades Unterschiede in der Regulation der Expression finden lassen, wurden bei den Nachkommen aus den verschiedenen Kreuzungsumgebungen einige Gene gezielt untersucht. Als Anhaltspunkt diente zunächst eine Filterhybridisierung mit cDNA von Kontrollen aus den verschiedenen Kreuzungsumgebungen. Die Filter enthielten ca. 1400 Transkriptionsfaktoren von *Arabidopsis*, die unter Pathogenstress reguliert wurden oder in Entwicklungsprozessen und Signaltransduktionswegen eine Rolle spielten (siehe Anhang). Dabei kristallisierten sich 19 Gene heraus, die signifikant zwischen den Kreuzungsumgebungen verschieden waren und aus denen vier Gene ausgewählt wurden (siehe 3.2.6 und Tabelle 15). Die vier ausgewählten Gene zeigten zwar signifikante Unterschiede auf den Filtern, die allerdings durch die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR) nur in einem Fall bestätigt werden konnten (Abbildung 37 A, C).

Mittels der Real-Time PCR wurden die Proben aus zwei Kältestressversuchen analysiert. Bei dem Vergleich der relativen Expressionsraten der Gene in den Kontrollen untereinander war im Trend nur das pseudo response regulator 9 Gen (PRR 9) in den Nachkommen aus 25 °C stärker exprimiert als in den Nachkommen aus 15 °C (Abbildung 37 A, C). Dieses Gen war auch auf den Filtern bei den Nachkommen aus der warmen Kreuzungsumgebung deutlich höher als in den Nachkommen aus der kalten Kreuzungsumgebung. Das pseudo response regulator 9 Gen hat wahrscheinlich eine wichtige Funktion im circadianen Rhythmus der Pflanze. Die bisherigen Erkenntnisse deuten auf eine Rolle in der komplexen Interaktion der Pflanze mit Licht und Temperatur hin (Eriksson et al. 2003, Salome und Robertson McClung 2005). Mutanten, die dieses Gen nicht exprimierten, zeigten eine verlängerte Oszillation von Transkripten circadian gebundener Gene über den üblichen 24 h Rhythmus hinaus (Salome und Robertson McClung 2005). Mutanten, die dieses Gene überexprimierten zeigten eine schnellere Blühinduktion auch unter Kurztagsbedingungen (Matsushika et al. 2002). Andalo et al. (1999) fanden bei *Arabidopsis*, dass die Nachkommen aus der warmen Kreuzungsumgebung später blühten als die Nachkommen aus der kalten Kreuzungsumgebung. Lacey (1996) fand bei Spitzwegerich, dass nicht nur die größeren Samen aus der kalten Kreuzungsumgebung schneller keimten, sondern auch eine

schnellere Blühinduktion bei den späteren Nachkommen dieser Samen. Roach und Wulff (1987) sahen einen der wenigen Einflüsse der Kreuzungsumgebung auf die Eigenschaften der Nachkommen in der Blühinduktion. Man kann spekulieren, dass in den hier durchgeführten Experimenten und im Gegensatz zu den Ergebnissen von Andalo et al. (1999) die Nachkommen aus der warmen Kreuzungsumgebung, aufgrund der größeren Samen und dem besseren Verhältnis der Speicherstoffe im Samen, schneller wachsen und schneller blühen. Allerdings sind die Pflanzen in diesen Versuchen nie bis zur Blüte beobachtet worden.

Wulff (1986 b) zeigte, dass parentale Effekte unter Stress deutlicher in Erscheinung treten können. Mit Hilfe des Kältestresses sollte, wie bei der Fichte, überprüft werden, ob die Nachkommen aus der warmen Kreuzungsumgebung empfindlicher waren als die Nachkommen aus der kalten Kreuzungsumgebung. Die Stressreaktion wurde mittels Chlorophyllfluoreszenz erfasst. In dunkeladaptierten Blättern konnten keine Unterschiede in  $F_v/F_m$  zwischen den gestressten Pflanzen und den Kontrollen bzw. zwischen den Nachkommen aus den verschiedenen Kreuzungsumgebungen beobachtet werden (Abbildung 36). Erst in Kombination mit dem Licht waren Effekte zu sehen. Unter Kältestress ist die Kohlenstoffassimilation gehemmt, was zu Einschränkungen im Elektronentransport und zu einer Schädigung bzw. Hemmung des Photosystems II durch Licht führt (van Heerden 2000, Savitsch et al. 2001). Wintergetreide steuern der Lichthemmung entgegen, indem sie die Aktivität der am Kohlenstoffwechsel beteiligten Enzyme neu regulieren und so den Stoffwechsel an diese Temperaturbedingungen anpassen (Huner et al. 1998). Savitsch et al. (2001) beobachtete bei Arabidopsis, dass überschüssige Lichtenergie am Photosystem II in Form von Wärme (nicht photosynthetische Löschung) abgeleitet wurde. Zu Beginn des Kältestresses zeigten die Arabidopsispflanzen aus beiden Kreuzungsumgebungen gegenüber den Kontrollen eine Reduktion der Quantenausbeute am Photosystem II ( $\Phi_{II}$ ). Dabei war bei den Nachkommen aus der kalten Kreuzungsumgebung eine stärkere Abnahme von  $\Phi_{II}$  zu beobachten als bei den Nachkommen aus der warmen Kreuzungsumgebung (Abbildung 35). Huner et al. (1998) beobachteten, dass zeitlich gesehen Organismen sich an die Kälte kombiniert mit Licht adaptieren, indem sie zuerst die photosynthetische Aktivität des Photosystems II herunterregulieren, dann die Antennengröße am Photosystem II reduzieren und schließlich die Aktivität der Enzyme im Kohlenstoffwechsel den Bedingungen anpassen. Es scheint als würden sich die Nachkommen aus der kalten Kreuzungsumgebung schneller an die neuen Temperaturen anpassen als die Nachkommen aus der warmen Kreuzungsumgebung.

Dafür spricht auch, dass sich  $\Phi_{II}$  im Verlauf des Experiments bei den Nachkommen aus der kalten Kreuzungsumgebung erholte, was mit einer Akklimatisierung der Photosynthese auf niedrigerem Niveau, wie von Savitsch et al. (2001) beobachtet, zusammenhängen könnte. Bei den Nachkommen aus der warmen Kreuzungsumgebung sanken am Ende des Kälteversuches die Werte von  $\Phi_{II}$  leicht (Abbildung 35).

In den Nachkommen beider Kreuzungsumgebungen war die Flavanon-3-hydroxylase (F3H) unter Kältestress stärker exprimiert. Wenn die relative Expressionsrate von F3H in den gestressten Pflanzen gegen die der Kontrolle verglichen wurde, war der Unterschied bei den Nachkommen aus der warmen Kreuzungsumgebung im Gegensatz zu den Nachkommen aus der kalten Kreuzungsumgebung in beiden untersuchten Kältestressexperimenten signifikant (Abbildung 38 B, D). F3H katalysiert den Schritt vom Flavanon zum Dihydroflavonol und steht damit, zusammen mit der Chalconsynthese, am Anfang der Flavonoid- bzw. Anthocyanbiosynthese. Anthocyane sind wasserlösliche Pigmente im Zellsaft. Sie gehören zu der Familie der Flavonoide und spielen als Schutzpigmente gegen hohe Lichtintensitäten und UV-Strahlung eine Rolle (Mancinelli 1983). Pelletier und Shirley (1996) konnten zeigen, dass im Stoffwechsel von *Arabidopsis* die Expressionen von Chalconsynthese und Flavanon-3-hydroxylase miteinander gekoppelt sind. Leywa et al. (1995) fanden in *Arabidopsis* eine vermehrte Synthese der Chalconsynthese, wenn die Pflanzen Kälte kombiniert mit Licht ausgesetzt waren, während Krens et al. (2002) eine erhöhte Expression von F3H in *Arabidopsis*blättern unter Kälte zeigen konnten. Transformierte Luzerne, die Chalconsynthese und F3H überexprimierte, zeigte unter Starklicht und unter Kälte kombiniert mit Licht eine tiefrote Färbung an Blättern und Stängeln (Ray et al. 2003). Die Nachkommen aus der warmen Kreuzungsumgebung könnten aufgrund der stärkeren Expression etwas mehr Anthocyane gebildet haben als die Nachkommen aus der kalten Kreuzungsumgebung. Diese verstärkte Bildung könnte dem Schutz des Photosystems II vor Lichthemmung dienen (Huner et al. 1998) und zu den besseren Chlorophyllfluoreszenzwerte im Licht bei den Nachkommen aus der warmen Kreuzungsumgebung zu Beginn des Kältestresses geführt haben. Um eindeutigere Aussagen treffen zu können, müsste die Expression der F3H zu verschiedenen Zeitpunkten des Kältestresses gemessen werden. Dann könnte gezeigt werden, ob die Anthocyanbildung in den Nachkommen der kalten Kreuzungsumgebungen zeitlich verschieden von den Nachkommen aus der warmen Kreuzungsumgebung einsetzt. In der Literatur gibt es widersprüchliche Angaben, in wie weit Anthocyane als Schutzpigmente bei Kältestress von Bedeutung sind. Mutanten, deren Anthocyanbildung gehemmt war,

konnten trotzdem Kältestress tolerieren (Leywa et al. 1995). Kälteempfindliche Arabidopsismutanten zeigten in anderen Versuchen eine zweifach geringere Bildung von Chalconsynthase und Flavanon-3-hydroxylase als der in gleicher Weise gestresste Wildtyp (Provart et al. 2003). Die Kälteversuche ergaben, dass die Nachkommen aus den verschiedenen Kreuzungsumgebungen verschieden auf den Stress reagierten. Während die Nachkommen aus der kalten Kreuzungsumgebung offensichtlich die Aktivitäten am Photosystem II neu regulierten, reagieren die Nachkommen aus der warmen Kreuzungsumgebung scheinbar mit einer vermehrten Anthocyanbildung. Es müssten noch weitere Parameter (Photosynthese u. a.) hinzugezogen werden, um definitiv sagen zu können, welche Nachkommen die empfindlicheren sind.

Kältestress beeinträchtigt über die Photosynthese das Wachstum der Pflanze. Die Nachkommen beider Kreuzungsumgebungen sind davon betroffen. Sowohl das no apical meristem (NAM) family Protein als auch das AP2 domain containing protein RAP 2.3 spielen eine Rolle in Wachstum und Entwicklung der Pflanzen. Die Mitglieder der NAM-Familie sind in der Bildung von Spross- und Wurzelapikalmeristemen beteiligt (Ooka et al. 2003). Sie beeinflussen wahrscheinlich Zellteilung und -wachstum (Souer et al. 1996). Das AP2 domain containing protein RAP 2.3 (AP2) gehört zu einer großen AP 2/ EREBP Multigenfamilie von DNA-bindenden Proteinen, die sich in die Unterfamilien AP2 und EREBP gliedert (Riechmann und Meyerowitz 1998). Die RAP 2 Proteine mit AP 2 Domäne sind an der Blütenbildung beteiligt, scheinen aber auch eine Funktion in der Entwicklung des vegetativen Gewebe zu haben (Okamoto et al. 1997). Bei den Nachkommen aus der kalten Kreuzungsumgebung sind beide Gene in den gestressten Pflanzen gegenüber den Kontrollen in einem Kältestressversuch signifikant herunterreguliert, in einem zweiten nicht. Dagegen sind bei den Nachkommen aus der warmen Kreuzungsumgebung in beiden Kältestressversuchen die AP2-Gene herunterreguliert. Das lässt keine eindeutige Aussage zu, welche Nachkommen durch den Kältestress mehr in ihrem Wachstum eingeschränkt waren, zeigt aber, dass in den Nachkommen offenbar unterschiedliche Regulationsmechanismen greifen.

Als Schlussfolgerung kann gesagt werden, dass die relativen Expressionsraten der vier untersuchten Gene zum Teil verschieden waren. Die im Trend stärkere Expression des PRR 9 Gens in den nichtgestressten Nachkommen aus der warmen Kreuzungsumgebung könnte ein Beleg dafür sein, dass parentale Effekte auch in den entwickelten Pflanzen noch ausgeprägt waren. Diese Versuche waren ein erster Ansatz. Es müssten mehr Gene in ihrer Expressionsrate untersucht werden, um eindeutige Aussagen zu treffen. Johnson et al.



(2005) konnten an Fichten zeigen, dass die Nachkommen aus der warmen Kreuzungsumgebung aufgrund des höheren Methylierungsgrades der Gesamt-DNA eine geringere Expression von Phytochromgenen aufwiesen.

#### **5.2.4 Schlussfolgerung und Ausblick**

Die Ergebnisse dieser Arbeit haben gezeigt, dass sowohl bei Fichte als auch bei Arabidopsis die Temperatur der Kreuzungsumgebung einen entscheidenden Einfluss auf die Eigenschaften der Nachkommen hat. Dieser Einfluss ist nicht ausreichend mit den Begriffen genomisches Imprinting und maternaler Effekt erklärbar. Diese Begriffe werden sehr spezifisch genutzt. Genomisches Imprinting zeigt mehr den Einfluss eines Elternteils auf einen bestimmten Genlocus, während die maternalen Effekte mehr Einfluss auf Samengröße und Nährstoffgehalt haben. Johnsen und Skroppa (1999) benutzten daher Ausdrücke wie „after effect“ oder „memory effect“ und konzentrierten sich auf die Einflüsse der Umwelt, die mit dem Genotypen der Eltern bzw. dem sich entwickelnden Embryo interagiert und damit epigenetisch wirken.

Die Fichte zeichnet sich dadurch aus, dass sie eine relative junge Art in Europa ist. Nach der letzten Eiszeit ist sie mit einer Verbreitungsrate von 10-40 km pro Jahrhundert nach Skandinavien eingewandert (Saxe et al. 2001). Sie kann sich scheinbar schnell an neue Umweltbedingungen anpassen und entsprechende Rassen und Ökotypen ausbilden (Schmidt-Vogt 1977, Skroppa Johnson 1997, Hänninen et al. 2001). Erst Schritte, um diese Eigenheit der Fichte zu verstehen, sind gemacht worden. Viele Experimente und Analysen sind noch nötig, da bisher die Einflüsse der Umwelt auf die Nachkommen mehr äußerlich im Wachstum und der Frostresistenz beobachtet wurden und es jetzt erste Anhaltspunkte dafür gibt, dass auch auf Gen- bzw. Proteinebene Veränderungen in den Nachkommen aus verschiedenen Kreuzungsumgebungen auftreten.

Arabidopsis wird als Modellorganismus zur Erforschung vieler Stoffwechselprozesse genutzt. Hier hat sich gezeigt, dass sich die Pflanze auch für Untersuchungen der Einflüsse der Kreuzungsumgebung auf die Nachkommenschaft eignet. Erste Schritte sind getan und sollten weiterverfolgt werden. Allerdings sind die Ergebnisse, die in Arabidopsis gefunden wurden, nicht 1:1 auf die Fichte übertragbar, zu einen wegen der Unterschiede in der Genomgröße, zu anderen wegen der systematischen Zugehörigkeit zu den verschiedenen Unterabteilungen Gymnospermen (Fichte) bzw. Angiospermen (Arabidopsis).

Im Hinblick auf die Klimaveränderungen mit steigenden Temperaturen und unterschiedlich starken Niederschlägen übers Jahr bzw. in den einzelnen Regionen, sollte das Vermögen der Natur, sich anpassen zu können, nicht unterschätzt werden. Ist der

Organismus in der Lage, veränderte Umweltbedingungen wahrzunehmen und mit regulatorischen Veränderungen im Genom auf sie zu reagieren, werden Pflanzen und Tiere sich schnell adaptieren können. So könnten die Nachkommen aus warmer Kreuzungsumgebung durch intensiveres Wachstum während der Vegetationsperiode und bessere Verbreitungschancen durch schnellere Keimung in Zukunft einen Vorteil haben. Es bleibt abzuwarten, ob die Klimaerwärmung in dem Maße eintritt wie prognostiziert und was plötzliche Kälteeinbrüche für eine Rolle spielen werden. Phänotypische Plastizität und natürliche Auslese werden also weiterhin die Artenvielfalt beeinflussen, zusammen mit dem Menschen.

## 6 Zusammenfassung

Die Gemeine Fichte (*Picea abies* L. [Karst.]) ist die häufigste Baumart in Deutschland. Aufgrund ihrer langen Generationszeit wurde davon ausgegangen, dass sie sich nicht schnell genug an sich ändernde Klimabedingungen anpassen kann. Neuere Arbeiten haben jedoch gezeigt, dass Nachkommen von Fichten, die in südlicher gelegenen Samenplantagen oder im Gewächshaus gekreuzt wurden, im Unterschied zu ihren Vollgeschwistern aus dem nördlicheren Ursprungsgebiet bzw. dem Freiland bei gleichen Anzuchtsbedingungen nicht nur einen späteren Knospenansatz im Herbst und einen späteren Knospenaustrieb im Frühjahr zeigten, sondern auch eine größere Empfindlichkeit bei Frost. Dieser Hinweis auf epigenetische Effekte, die eine bessere Anpassung ermöglichen, war der Ausgangspunkt für die vorliegende Arbeit. Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss der Temperatur während der Kreuzung der Eltern auf die Stressresistenz der Nachkommen zu untersuchen. Zur Untersuchung dieses Phänomens wurden ökophysiologische, biochemische und molekularbiologische Methoden an *Arabidopsis thaliana* und Fichte eingesetzt.

Die Untersuchungen an der Fichte wurden jeweils an Vollgeschwisterpaaren, deren Eltern sowohl im Gewächshaus (warm) als auch im Freiland (kalt) gekreuzt worden waren, durchgeführt. Nachkommen der gleichen Eltern, aus der warmen oder kalten Kreuzungsumgebung, wurden Froststress bis  $-25\text{ °C}$  ausgesetzt und ihre Stressreaktion anhand von Messungen der Chlorophyllfluoreszenz und Elektrolytleitfähigkeit untersucht. Dabei konnte bei einem Vollgeschwisterpaar bestätigt werden, dass die Nachkommen aus der warmen Kreuzungsumgebung frostempfindlicher waren als die Nachkommen aus der kalten Kreuzungsumgebung. Ein weiteres Geschwisterpaar zeigte keine signifikanten Unterschiede.

Da Frost- und Trockenstress auf Zellebene ähnliche Reaktionen auslösen, wurden in weiteren Versuchen drei Geschwisterpaare der Fichte in ihrer Reaktion auf Trockenstress getestet. Ein Geschwisterpaar zeigte, dass die Nachkommen aus der kalten Kreuzungsumgebung ihre photosynthetische Aktivität dem Stress besser anpassten als die Nachkommen aus der warmen Kreuzungsumgebung. Bei den beiden anderen Geschwisterpaaren wurde dies nicht beobachtet. Jedoch zeigten biochemische Analysen, dass bei den trockengestressten Nachkommen aus der kalten Kreuzungsumgebung eine neue Proteindoppelbande bereits nach 14 Tagen erschien, während sie bei den gestressten Nachkommen aus der warmen Kreuzungsumgebung erst nach 21 Tagen stärker auftrat.

Vollgeschwisterpaare aus unterschiedlichen Kreuzungsumgebungen wurden zu Herkünften zusammengefasst und miteinander verglichen. Es stellte sich heraus, dass die Herkunft, die weniger Frostschäden zeigte, auch die unempfindlichere gegenüber Trockenheit war. Eine Schutzfunktion könnte dabei die höhere Aktivität der Superoxiddismutase in den Pflanzen der resistenteren Herkunft im Vergleich zur empfindlicheren Herkunft haben.

Da die Stressreaktion der Fichte auf Proteinebene bisher kaum untersucht wurde, wurde mit Hilfe der zweidimensionalen Elektrophorese der Einfluss beginnender Trockenheit auf das Proteinmuster untersucht. Obwohl noch keiner der ökophysiologischen Parameter signifikante Unterschiede zwischen gut mit Wasser versorgten und nicht gegossenen Fichten anzeigte, konnten mittels LC-MS/MS schon Veränderungen von Proteinen des sauerstoffentwickelnden Komplexes und der Ribulose-1,5-bisphosphat Carboxylase/Oxygenase nachgewiesen werden. Mittels zweidimensionaler Elektrophorese konnte bei einem Vollgeschwisterpaar ebenfalls gezeigt werden, dass sich unterschiedliche Kreuzungsumgebungen der Eltern in Unterschieden in der Proteinzusammensetzung äußerten.

Parallel zur Fichte wurden ähnliche Untersuchungen mit *Arabidopsis thaliana* (Col-0) durchgeführt. Mutterpflanzen wurden in Klimakammern bei 25 °C bzw. 15 °C mit sich selbst gekreuzt. Untersuchungen der Samen beider Kreuzungsumgebungen ergaben, dass der Samen aus der warmen Kreuzungsumgebung schwerer war, aber über niedrigere Kohlenhydrat- und Lipidkonzentrationen verfügte als der Samen aus der kalten Kreuzungsumgebung. Dagegen waren Protein- und Stickstoffkonzentration in dem Samen aus der warmen Kreuzungsumgebung höher. Das bessere Nährstoffverhältnis und ein größerer Embryo waren wahrscheinlich die Ursache für die schnellere Keimung und das etwas schnellere Wachstum der Nachkommen aus der 25 °C warmen Kreuzungsumgebung im Vergleich zu den Nachkommen aus der 15 °C kalten Kreuzungsumgebung. In ihrer Reaktion auf Kältestress deutet sich anhand der Chlorophyllfluoreszenzdaten eine bessere Anpassung der Nachkommen aus der kalten Kreuzungsumgebung an. Es wurden keine markanten Veränderungen des Blattproteom gefunden. Molekularbiologische Untersuchungen mit Hilfe der quantitativen Real-Time-PCR zeigten für die Transkriptmengen von vier ausgewählten Genen folgende Unterschiede: Unter Kontrollbedingungen war bei den Nachkommen aus der warmen Kreuzungsumgebung ein pseudo response regulator 9 Gen (At2g46790) stärker transkribiert als bei den Nachkommen aus der kalten Kreuzungsumgebung. Unter Kältestress war eine Flavanon-3-Hydroxylase (At3g51240) in den Nachkommen aus der

warmen Kreuzungsumgebung relativ zur Kontrolle signifikant heraufreguliert, jedoch nicht in den Nachkommen der kalten Kreuzungsumgebung.

In der Gesamtbewertung der Ergebnisse lässt sich festhalten, dass die in der Literatur aufgezeigten Unterschiede von Fichten unterschiedlicher Kreuzungsumgebungen im Hinblick auf deren Stressreaktion hier bei einigen Vollgeschwisterpaaren beobachtet wurden. Es konnte erstmals bei Fichte bestätigt werden, dass frosttolerante Herkünfte auch trockenoleranter waren. Weniger klar waren die Unterschiede innerhalb einer Herkunft, wenn die gleichen Eltern bei unterschiedlichen Temperaturen gekreuzt wurden. Unterschiede in der aktuellen Quantenausbeute oder der Elektrolytleitfähigkeit wiesen auf ein verändertes Verhalten der Nachkommen aus den verschiedenen Kreuzungsumgebungen hin. Jedoch hing dieses Verhalten von den Eltern der Vollgeschwisterpaare und deren Reaktion auf die Umwelt ab. Das veränderte Verhalten konnte bisher nicht an der Veränderung einzelner Proteine oder Enzyme festgemacht werden. *Arabidopsis thaliana* wurde als leicht handhabbare Modellpflanze zur Hilfe genommen. Hier konnten die Einflüsse der Umgebungstemperatur hauptsächlich am Nährstoffgehalt des Samens ausgemacht werden. Expressionsanalysen brachten erste Hinweise, dass in den Nachkommen aus unterschiedlichen Kreuzungsumgebungen Gene unterschiedlich stark transkribiert werden. Es sind aber zusätzliche Experimente und Analysen nötig, um diese Befunde zu klären und in ihrer Bedeutung für die Stressanpassung zu analysieren.

## 7 Literaturverzeichnis

- Abbasi FM, Komatsu S** (2004) A proteomic approach to analyze salt-responsive proteins in rice leaf sheath. *Proteomics* 4: 2072-2081
- Adams S, Vinkenoog R, Spielmann M, Dickinson HG, Scott RJ** (2000) Parent-of-origin effects on seed development in *Arabidopsis thaliana* require DNA methylation. *Development* 127: 2493-2502
- Adler LS, Kittelson PM** (2004) Variation in *Lupinus arboreus* alkaloid profiles and relationships with multiple herbivores. *Biochemical Systematics and Ecology* 32: 371-390
- Allagulova ChR, Gimalov FR, Shakirova FM, Vakhitov VA** (2003) The plant dehydrins: structure and putative functions. *Biochem (Moscow)* 68: 945-951
- Allemann M, Doctor J** (2000) Genomic imprinting in plants: observations and evolutionary implications. *Plant Mol Biol* 43: 147-161
- Alonso R, Elvira S, Castillo FJ, Gimeno BS** (2001) Interactive effects of ozone and drought stress in pigments and activities of antioxidative enzymes in *Pinus halepensis*. *Plant Cell Environ* 24: 905-916
- Andalo C, Mazer SJ, Godelle B, Machon N** (1999) Parental environmental effects on life history traits in *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae). *New Phytol* 142: 173-184
- Andalo C, Raquin C, Machon N, Godelle B, Mousseau M** (1998) Direct and maternal effects of elevated CO<sub>2</sub> on early root growth of germinating *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Ann Bot* 81: 405-411
- Andersson B** (1994) After effects of maternal environment on autumn frost hardiness in *Pinus silvestris* seedlings in relation to cultivation techniques. *Tree Phys* 14: 313-322
- Asada K, Takahashi M, Nagate M** (1974) Assay and inhibitors of spinach superoxide dismutase. *Agr Biol Chem* 38: 471-473
- Bae H, Sicher R** (2004) Changes of soluble protein expression and leaf metabolite levels in *Arabidopsis thaliana* grown in elevated atmospheric carbon dioxide. *Field Crop Res* 90: 61-75
- Baker NR; Rosenqvist E** (2004) Applications of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: an examination of future possibilities. *J Exp Bot* 55: 1607-1621
- Baumann R** (2004) DNA-Methylierung nach abiotischen und biotischen Einflüssen und Expressionsanalyse pathogeninduzierter Gene in *Picea abies* (L.) Karst.. Dissertation Technische Universität München
- Begon ME, Townsed CR, Harper JL** (1998) Ökologie. Spektrum, Akad. Verl. Heidelberg
- Bernardi R, Nali C, Gargiulo R, Pugliesi C, Lorenzini G, Durante M** (2001) Protein pattern and Fe-Superoxide dismutase activity of bean plants under sulphur dioxide stress. *J Phytopathology* 149: 477-480
- Beutler** (1978) Enzymatic determination of starch in foods by hexokinase method. *Starch* 30: 309-312
- Bigras F, Bonlieu J** (1997) Influence of maternal environment on frost tolerance of *Picea glauca* progenies. In: Proceedings of the twenty-sixth meeting of the Canadian Tree Improvement Association. Part 2: 91
- Binder WD, Fielder P** (1996) Chlorophyllfluorescence as an indicator of frost hardiness in white spruce seedlings from different latitudes. *New Forest* 11: 233-253
- Blödner C, Skroppa T, Johnsen O, Polle A** (2005) Freezing tolerance in two Norway spruce (*Picea abies* [L.] Karst.) progenies is physiologically correlated with drought tolerance. *J Plant Physiol.* 162: 549-558

- Blum H, Beier H, Gross HJ** (1987) Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamid gels. *Electrophoresis* 8: 93-99
- Bray EA** (1997) Plant response to water deficit. *Trends in Plant Science* 2: 48-54
- Burr K, Hawkins CDB, Hironelle S, Binder WD, George MF, Repo T** (2001) Methods of measuring cold hardiness of conifers. In: *Conifer cold hardiness*. Bigras FJ, Colombo SJ (eds.), Kluwer Academic Publishers, Netherland, pp. 369-401
- Canvin DT** (1965) The effect of temperature on the oil content and fatty acid composition of the oils from several oil seed crops. *Can J Bot* 43: 63-69
- Carroll NV, Longley RW, Roe JH** (1956) Determination of glucogen in liver and muscle by use of anthrone reagent. *J Biol Chem* 220: 583-593
- Chang S, Puryear J, Cairney J** (1993) A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Mol Biol Rep* 11: 113-116
- Charest C, Potvin C** (1993) Maternally-induced modification of progeny phenotypes in the C<sub>4</sub> weed *Echinochloa crus-galli*: An analysis of seed constituents and performance. *Oecologia* 93: 383-388
- Chaves M., Maroco JP, Pereira JS** (2003) Understanding plant response to drought-from genes to the whole plant. *Func Plant Biol* 30:239-264
- Clapham WM, Willcott JB, Fedders JM** (2000) Effects of seed maturation temperature on seed yield characteristics and subsequent generations of lupin. *Crop Science* 40: 1313-1317
- Close T** (1996) Dehydrins: Emergence of biochemical role of a family of plant dehydration proteins. *Physiol Plant* 97: 795-803
- Costa P, Bahrman N, Frigerio JM, Kremer A, Plomion C** (1998) Water-deficit-responsive proteins in maritime pine. *Plant Mol Biol* 38: 587-596
- Cullis CA** (2005) Mechanisms and control of rapid genomic changes in flax. *Ann Bot* 95: 201-206
- Damerval C, de Vienne D, Zivy M, Thiellement H** (1986) Technical improvements in two-dimensional electrophoresis increase level of genetic variation detected in wheat seedling proteins. *Electrophoresis* 7: 52-54
- David JL, Zivy M, Cardin ML, Brabant P** (1997) Protein evolution in dynamically managed populations of wheat: adaptive responses to macro-environmental conditions. *Theor Appl Genet* 95: 932-941
- Deng X, Scarth R** (1998) Temperature effects on fatty acid composition during development of low-linolenic oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Journal of the American oil chemists society* 75: 759-766
- de Vitry C, Olive J, Drapier D, Recouvreur, Wollmann FA** (1989) Posttranslational events leading to the assembly of photosystem II protein complex: A study using photosynthesis mutants for *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Cell Biol* 109: 991-1006
- Dhillon SS** (1987) DNA in tree species. In: *Cell and tissue culture in forestry*, Vol. 1. Bonga JM, Durzan DJ (eds.), Marinus Nijhof Publ., Dordrecht
- Donohue K, Schmitt J** (1998) Maternal environmental effects in plants: Adaptive plasticity? In: *Maternal effects as adaptations*. Mousseau TA, Fox CW (eds), pp 137-158, Oxford University Press, Oxford-New York
- Dormling I, Johnsen O** (1992) Effects of the parental environment on full-sib families of *Pinus sylvestris*. *Can J For Res* 22: 88-100
- Dreyer E** (1997) Photosynthesis and drought in forest trees. In: *Trees-Contribution to modern tress physiology*. Rennenberg H, Eschrich W, Ziegler H (eds.) pp 215-238, Backhuys Publishers, Leiden
- Eastman PAK, Camm EL** (1995) Regulation of photosynthesis in interior spruce during water stress changes in gas exchange and chlorophyll fluorescence. *Tree Physiol* 15: 229-235

- Eastman PAK, Rashid A, Camm EL** (1997) Changes of the photosystem 2 activity and thylakoid proteins in spruce seedlings during water stress. *Photosynth* 34: 201-210
- England S, Seifert M** (1990) Precipitation techniques. In: Guide to protein purification. Deutscher MP (ed.), Ed.1, Vol 182; Academic Press London pp. 285-300
- Eriksson G** (1998) Evolutionary forces influencing variation among populations of *Pinus sylvestris*. *Silva Fennica* 32(2): 173-184
- Eriksson ME, Hanano S, Southern MM, Hall A, Millar AJ** (2003) Resoponse regulator homologues have complementary, light-dependent functions in the Arabidopsis circadian clock. *Planta* 218: 159-162
- Fernandez M, Royo A, Gil L, Pardos JA** (2003) Effects of temperature on growth and stress hardening development of phytotron-grown seedlings of Aleppo pine (*Pinus halepensis* Mill.). *Ann For Sci* 60: 277-284
- Finnegan EJ, Peacock WJ, Dennis ES** (2000) DNA methylation, a key regulator of plant development and other processes. *Current Opinion in Genetics and Development* 10: 217-223
- Finnegan EJ, Genger RG, Kovac K, Peacock WJ, Dennis ES** (1998) Methylation controls the low-temperature induction of flowering in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 5824-5829
- Flexas J, Bota J, Cifre J, Escolana JM, Galmes J, Gulias J, Lefi EK, Martinez-Canellas SF, Moreno MT, Ribas-Carbo M, Riera D, Sampol B, Medrano H** (2004) Understanding down-regulation of photosynthesis under water stress: Future prospects and searching for physiological tools for irrigation management. *Ann appl Biol* 144: 273-283
- Galloway LF** (2001 a) The effect of maternal and paternal environments of seed characters in the herbaceous plant *Campanula americana* (Campanulaceae). *Am J Bot* 88: 832-840
- Galloway LF** (2001 b) Parental Environmental effects on life history in the herbaceous plant *Campanula americana*. *Ecology* 82: 2781
- Gehring M, Chol Y, Fischer RL** (2004) Imprinting and Seed Development. *The Plant Cell* 18: S203-S213 Supplement
- Ghanotakis DF** (1990) Photosystem II and the oxygen-evolving complex. *Annu Rev Plant Physiol Biol* 41: 255-276
- Giardi MT, Cona A, Geiken B, Kucera, Masojidek J, Mattoo AK** (1996) Long-term drought stress induces structural and functional reorganisation of photosystem II. *Planta* 199: 118-125
- Gillies SL, Binder WD** (1996) The effect of sub-zero temperatures in the light and dark on cold-hardened, dehardened and newly flushed white spruce (*Picea glauca* [Moench.] Voss) seedlings. *New Forests* 13: 91-104
- Görg A, Obermaier C, Boguth G, Harder A, Scheibe B, Wildgruber R, Weiss W** (2000) The current state of tow-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* 21: 1037-1053
- Görg A, Weiss W** (2000) Two-dimensional electrophoresis with Immobilized pH gradients. In: Proteom research: Two-dimensional gel electrophoresis and identification methods. Rabiloud (ed.). Springer Verlag Berlin Heidelberg, pp 57-106
- Gray BD, Steckel JR, Dearman J, Brocklehurst PA** (1988) Some effects of temperature during seed development on carrot (*Daucus carota*) seed growth and quality. *Ann appl Biol* 112: 367-376
- Greenwood MS, Hutschinson KW** (1996) Genetic aftereffects of increased temperature in Larix. In: Proceedings of the 1995 Mtg Norther Global Change Programm. Hom J, O'brien K (eds). USFS Rpt NE-214 : 481-490



- Grossnickle SC** (2000) Ecophysiology of northern spruce species: The performance of planted seedlings. NRC Research Press, Ottawa, Ontario, Canada. 409 pp
- Gutermann Y** (1992) Maternal effects on seeds during development. In: Seeds: The ecology of regeneration on plant communities. Fenner M (ed.) 2<sup>nd</sup> edition, CABI Publ. Wallingford, pp 59-84
- Guy** (2003) Freezing tolerance of plants: Current understanding and selected emerging concepts. *Can J Bot* 81: 1216-1223
- Hajduch M, Rakwal R, Agrawal GK, Yonekura M, Pretova A** (2001) High resolution two-dimensional electrophoresis separation of proteins from metal stressed rice (*Oryza sativa* L.) leaves: Drastic reductions/fragmentation of ribulose-1,5 biphosphate carboxylase/oxygenase and induction of stress-related proteins. *Electrophoresis* 22: 2824-2831
- Hajheidari M, Abdollahain-Noghabi M, Askari H, Heidari M, Sadeghain SY, Ober ES, Salekdeh GH** (2005): Proteome analysis of sugar beet leaves under drought stress. *Proteomics* 5: 950-960
- Hänninen H** (1991) Does climatic warming increase the risk of frost damage in northern trees. *Plant Cell Environment* 14 (5): 449-454
- Hänninen H, Beuker E, Johnsen O, Leinonen I, Murray M, Sheppard L, Skroppa T** (2001) Impacts of climate change on cold hardiness of conifers. In: Conifer cold hardiness. Bigras FJ, Colombo SJ (eds.), Kluwer Academic Publishers, Netherland, pp. 305-333
- Hansen J** (2000) Überleben in der Kälte-Wie Pflanzen sich vor Froststress schützen. *Biologie unsere Zeit* 30:24-34
- Havliš J, Thomas H, Šebela M, Shevchenko A** (2003) Fast-response proteomics by accelerated in-gel digestion of proteins. *Anal. Chem.* 75: 1300-1306
- Heerden PDR, Krüger GHJ** (2000) Photosynthetic limitation in soybean during cold stress. *South African Journal of Science* 96: 201-206
- Herde M** (2003) Identifikation und Charakterisierung von Transkriptionsfaktoren, die an der Biosynthese von flüchtigen Terpenen beteiligt sind. Diplomarbeit, Georg August Universität Göttingen
- Huner NPA, Öquist G, Sarhan F** (1998) Energy balance and acclimation to cold. *Trends in Plant Science* 3: 224-230
- IPCC** (2001a) Climate Change 2001: Synthesis Report. A contribution of working groups I, II and III to the third assessment report in the intergovernmental panel in climate change [Watson RT and the core writing team (eds.)]. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom, and New York, NY, USA, 398 pp.
- IPCC** (2001) b Climate Change 2001: Impacts, adaptation and vulnerability. A contribution of working group II to the third assessment report in the intergovernmental panel in climate change [McCarthy J and the core writing team (eds.)]. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom, and New York, NY, USA, 1042 pp.
- Johnsen Ø, Fossdal CG, Nagy N, Molmann J, Dählen O, Skroppa T** (2005) Climatic adaptation in *Picea abies* progenies is affected by the temperature during zygotic embryogenesis and seed maturation. *Plant Cell Environment* 1-13
- Johnsen Ø, Skroppa T** (2001) The Influence of the environment during sexual reproduction on adaptations of conifers along latitudinal and altitudinal gradients. In: Trends in European forest tree physiology research. Huttunen S, Heikkilä, Bucher J, Sundberg D, Jarvis P, Matyssek R (ed.), Kluwer Academic Publishers, Netherland
- Johnsen Ø, Skroppa T** (1997) Parents of Norway spruce adjust the performance of their progeny according to changes in climate and weather conditions during female flowering. In: Impacts of global change on tree physiology and forest ecosystems. Mohren GMJ et al (eds.), Kluwer Academic Publishers, Netherland

- Johnsen Ø, Skråppa T** (1996) Adaptive properties of *Picea abies* progenies are influenced by environmental signals during sexual reproduction. *Euphytica* 92: 67-71
- Johnsen Ø, Skråppa T, Junttila O, Daehlen OG** (1996) Influence of the female flowering environment on autumn frost-hardiness in *Picea abies* progenies. *Theor Appl Gen* 92: 797-802
- Johnsen Ø, Skråppa T, Haug G, Apeland I, Ostreng G** (1995) Sexual reproduction in a greenhouse and reduced autumn frost hardiness of *Picea abies* progenies. *Tree Physiol* 15: 551-555
- Johnsen Ø, Ostreng G** (1994) Effects of plus tree selection and seed orchard environment on progenies of *Picea abies*. *Can J For* 24: 32-38
- Johnsen Ø** (1989) Freeze-testing young *Picea abies* plants: A methodological study. *Scand J For Res* 4: 351-367
- Johnsen Ø** (1989a) Phenotypic changes in progenies of northern clones of *Picea abies* (L.) Karst. grown in a southern seed orchard. I Frost Hardiness in a phytotron experiment. *Scand J For Res* 4: 317-330
- Johnsen Ø** (1989b) Phenotypic changes in progenies of northern clones of *Picea abies* (L.) Karst. grown in a southern seed orchard. II Seasonal growth rhythm and height in field trials. *Scand J For Res* 4: 331-341
- Johnsen Ø** (1989c) Phenotypic changes in progenies of northern clones of *Picea abies* (L.) Karst. grown in a southern seed orchard. III Climatic damage and growth in a progeny trial. *Scand J For Res* 4: 343-350
- Kalisz S, Purugganan** (2004) Epialleles via DNA methylation: consequences of plant evolution. *Trends in Ecology and Evolution* 19: 309-314
- Kaminska-Rozek E, Pukacki PM** (2004) Effect of water deficit on oxidative stress and degradation of cell membranes in needles of Norway spruce (*Picea abies*). *Acta Physiol Plant* 26: 431-442
- Kawasaki S, Miyake C, Kohchi T, Shinichiro F, Uchida M, Yokota A** (2000) Response of wild watermelon to drought stress: Accumulation of ArgE homologue and citrulline in leaves during water deficits. *Plant Cell Physiol* 41: 864-873
- Kitajima M, Butler WL** (1975) Quenching of chlorophyll fluorescence and primary photochemistry in chloroplasts by dibromothymoquinone. *Biochim biophys Acta* 376: 105-115
- Kreps JA, Wu Y, Chang HS, Zhu T, Wang X, Harper JF** (2002) Transcriptome changes for *Arabidopsis* in response to salt, osmotic, and cold stress. *Plant Physiol* 2002 130: 2129-2141
- Kronfuss G, Polle A, Tausz M, Havranek WM, Wieser G** (1998) Effects of ozone and mild drought stress on gas exchange, antioxidants and chloroplast pigments in current-year needles of young Norway spruce [*Picea abies* (L.) Karst.]. *Trees* 12: 482-489
- Lacey E, Roach D, Herr D, Kincaid, Perrott R** (2003) Multigenerational effects of flowering and fruiting phenology in *Plantago lanceolata*. *Ecology* 84: 2462-2475
- Lacey EP** (1998) What is an adaptive environmentally induced parental effect? In: Maternal effects as adaptations. Mousseau TA, Fox CW (eds), pp 54-66, Oxford University Press, Oxford-New York
- Lacey EP, Smith S, Case AL** (1997) Parental effects on seed mass: Seed coat but not embryo/endosperm effects. *Am J Bot* 84: 1617-1620
- Lacey EP** (1996) Parental effects in *Plantago lanceolata* L. I: A growth chamber experiment to examine pre- and postzygotic temperature effects. *Evolution* 50: 865-878

- Lämmli UK** (1970) Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685
- Lamontagne M, Bigras FJ, Margolis HA** (2000) Chlorophyll fluorescence and CO<sub>2</sub> assimilation of black spruce seedlings following frost in different temperature and light conditions. *Tree Phys* 20: 249-255
- Leinhos V, Bergmann H** (1995) Changes in the yield, lignin content and protein patterns of barley (*Hordeum vulgare* cv. Alexis) induced by drought stress. *Angew Bot* 69: 206-210
- Leuschner C, Schipka F** (2004) Vorstudie Klimawandel und Naturschutz in Deutschland. Bundesamt für Naturschutz (BfN), BfN-Scripten 115 (Abschlußbericht eines F+E Vorhabens zur Erstellung einer Literaturstudie)
- Levenson JM, Sweatt DJ** (2005) Epigenetic mechanism in memory formation. *Nature reviews/neuro* 6: 108-118
- Leywa A, Jarillo JA, Salinas J, Martinez-Zapater JM** (1995) Low temperature induces the accumulation of phenylalanine-ammonia-lyase and chalcone synthase mRNA of *Arabidopsis* in light-dependent manner. *Plant Physiol* 108: 39-46
- Lichtenthaler HK** (1996) Vegetation stress: an introduction to the stress concept in plants. *J Plant Physiol* 148: 4-14
- Liesebach M** (2002) On the adaptability of Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) to the projected change of climate in Germany. *Forstwissenschaftliches Centralblatt* 121 Supplement 1: 130-144
- Lindner M, Cramer W** (2002) German forest sector under global change: In interdisciplinary impact assessment. *Forstwissenschaftliches Centralblatt* 121 Supplement 1: 3-17
- Major JE, Barsi DC, Mosseler A, Campbell M, Rajora OP** (2003) Light-energy procession and freezing-tolerance traits in red spruce and black spruce: Species and seed-source variation. *Tree Physiol* 23: 685-694
- Mancinelli AL** (1983) The photoregulation of Anthocyanin synthesis. In: *Encyclopedia of plant physiology: new series*, Vol. 16. Shropshire W, Mohr H (eds.), Springer Verlag Berlin, Heidelberg, pp. 456
- Martinez CA, Loureiro ME, Marco AO, Maestri M** (2001) Differential response of superoxide dismutase in freezing resistant *Solanum curtilobum* und freezing sensitive *Solanum tuberosum* subjected to oxidative and water stress. *Plant Sci* 160: 505-515
- Matsushika A, Imamura A, Ymashino T, Mizuno T** (2002) Aberrant expression of the light-inducible and circadian-regulated APRR 9 gene belonging to the circadian-associated APRR1/TOC quintet results in the phenotype of early flowering in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 43: 833-843
- Matzke M, Matzke AJM** (1993) Genomic imprinting in plants: parental effects and trans inactivation phenomena. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 44: 53-76
- Maxwell K, Johnson GN** (2000) Chlorophyll fluorescence – a practical guide. *J Exp Bot* 51: 659-668
- Mazer SJ, Gorchov DL** (1996) Parental effects on progeny phenotype in plants: Distinguishing genetic and environmental causes. *Evolution* 50: 44-53
- Mazer SJ, Wolfe LM** (1998) Density-mediated maternal effects on seed size in wild radish: Genetic variation and its evolutionary implication. In: *Maternal effects as adaptations*. Mousseau TA, Fox CW (eds), pp 323-343, Oxford University Press, Oxford-New York
- McCord JM, Fridovich I** (1969) Superoxide dismutase: An enzymatic function for erythrocyte hemocopyrin. *J Biol Chem* 244: 6049-6055

- McKersie BD, Murnagham J, Jones KS, Bowley SR** (2000) Iron-superoxide dismutase expression in transgenic alfalfa increasing winter survival without a detectable increase in photosynthetic oxidative stress tolerance. *Plant Physiol* 122: 1427-1437
- Meineke DW, Cherry M, Dean C, Rounsley SD, Koornneef M** (1998) *Arabidopsis thaliana*: A model plant for genome analysis. *Science* 282: 678-682
- Messing M, Grossnicklaus U** (1999) Genomic Imprinting in Plants in Ohlson (Autor): Genomic imprinting a interdisciplinary approach. Springer Verlag Berlin-Heidelberg
- Meyerowitz EM** (1987) *Arabidopsis thaliana*. *Ann Rev Genet* 21: 93-111
- Minagawa J, Takahashi Y** (2004) Structure, function and assembly of photosystem II and its light-harvesting proteins. *Photosynthesis research* 82: 241-263
- Miyao M, Murata N** (1989) The mode of binding of three extrinsic proteins of 33 kDa, 23 kDa and 18 kDa in the photosystem II complex of spinach. *Biochim Biophys Acta* 977: 315-321
- Munir J, Dorn LA, Donohue K, Schmitt J** (2001) The effect of maternal photoperiod on seasonal dormancy in *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae). *Am J Bot* 88: 1240-1249
- Murashige T, Skoog F** (1962) A revised Medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15: 473
- Neuhoff V** (1990) Die kolloidale Coomassie-Blau-Färbung von Proteinen und Peptiden in Polyacrylamidgelen: Schnell, untergrundfrei und mit Nanogramm-Empfindlichkeit. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 371: 10-11
- Neuner G, Buchner O** (1999) Assessment of foliar frost damage: A comparison of *in vivo* chlorophyll fluorescence with other viability tests. *J Appl Bot* 73: 50-54
- Nultsch W** (1991) Allgemeine Botanik. Georg Thieme Verlag Stuttgart, pp. 560
- Okamoto JK, Caster B, Villarroel R, van Montagu M, Jofuku KD** (1997) The AP2 domain of APETALA2 defines a large new family of DNA binding proteins of *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci* 94: 7076-7081
- Ooka H, Sator K, Doi K, Nagata T, Otomo Y, Murakami K, Matsubara K, Osato N, Kawai J, Carninci P, Hayashizaki Y, Suzuki K, Kojima K, Takahara Y, Yamamoto K, Kikuchi S** (2003) Comprehensive analysis of NAC family Genes on *Oryza sativa* and *Arabidopsis thaliana*. *DNA Research* 10: 239-247
- op den Camp RGL, Przybyla D, Ochsenbein C, Laloi C, Kim C, Danon A, Wagner D, Hideg E, Göbel C, Feussner I, Nater M, Apel K** (2003) Rapid induction of distinct stress response after the release of singlet oxygen in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 15: 2320-2332
- Öquist G, Gardeström P, Huner NPA** (2001) Metabolic changes during cold acclimation and subsequent freezing and thawing. In: Conifer cold hardiness. Bigras FJ, Colombo SJ (eds.), Kluwer Academic Publishers, Netherland, pp. 137-163
- Öquist G, Huner NPA** (2003) Photosynthesis of overwintering evergreen plants. *Annu Rev Plant Biol* 54: 329-355
- Ouerghi Z, Rémy R, Ouelhazi L, Ayadi A, Brulfert J** (2000) Two dimensional electrophoresis of soluble leaf proteins, isolated from two wheat species (*Triticum durum* and *Triticum aestivum*) differing in sensitivity towards NaCl. *Electrophoresis* 21: 2487-2491
- Owens JN, Johnsen O, Dählen OG, Skroppa T** (2001) Potential Effects of temperature on early reproductive development and progeny performance in *Picea abies* (L.) Karst. *Scan. J. For. Res.* 16: 221-237
- Palomaki V, Holopainen JK, Holopainen T** (1994) Effects of drought and waterlogging on ultrastructure of Scots pine and Norway spruce needles. *Trees* 9: 98-105
- Payton P, Allen RD, Torlinder N, Haladay AS** (1997) Overexpression of chloroplast-targeted Mn superoxide dismutase in cotton (*Gossypium hirsutum* L. cv. Coker 312)

- does not alter the reduction photosynthesis after short exposures to low temperature and high light intensity. *Photosyn Res* 52: 233-244
- Pearce RS** (1999) Molecular analysis of acclimation to cold. *Plant Growth Regulation* 29: 47-76
- Pelletier MK, Shirley BW** (1996) Analysis of Flavanone 3-hydroxylase in *Arabidopsis* seedlings. *Plant Physiol* 111: 339-345
- Perez de la Vega M** (1996) Plant genetic adaptedness to climatic and edaphic environment (1996) *Euphytica* 92: 27-38
- Pérez-Bueno ML, Rahoutei J, Sajnani C, Garcia-Luque I, Barón M** (2004) Proteomic analysis of the oxygen-evolving complex of photosystem II und biotic stress: Studies on *Nicotiana benthamiana* infected with tobamoviruses. *Proteomics* 4: 418-425
- Peterson GL** (1977) A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Analyt Biochem* 83: 346-356
- Pfaffl MW** (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids research* 29: 2002-2007
- Pfaffl MW, Graham WH, Dempfle L** (2002) Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acid Research* 30: 1-10
- Phela D, Wang W, Altman A, Shoseyov O, Bartels D** (1997) Differential accumulation of water stress-related proteins, sucrose synthase und soluble sugars in *Populus* species that differ in their water stress response. *Physiol Plant* 99: 153-159
- Pinhero RG, Paliyath G, Yada RY, Murr DP** (1999) Chloroplast membrane organisation in chilling-tolerant and chilling-sensitive Maize seedlings. *J Plant Physiol* 155: 691-698
- Polle A., Schwanz P., Rudolf C.** (2001) Developmental and seasonal changes of stress responsiveness in beech leaves. *Plant Cell Environ* 24: 821-829
- Polle A** (1996) Mehler reaction: Friend or foe in photosynthesis? *Botanica Acta* 109 (2): 84-89
- Polle A, Kröniger W, Rennenberg H** (1996) Seasonal fluctuations of ascorbat-related enzymes: Acute and delayed effects of late frost in spring on antioxidative systemes in needles of Norway spruce (*Picea abies* L.). *Plant Cell Physiol* 37:717-725
- Polle A, Chakrabarti K, Schürman W, Rennenberg H** (1990) Composition and Properties of hydrogen peroxide decomposing systems in extracellular and total extracts from needles of Norway spruce *Picea abies* L., Karst.). *Plant Physiol* 94: 312-319
- Polle A, Krings B, Rennenberg H** (1989) Superoxide dismutase activity in needles of Norwegian spruce trees (*Picea abies*, L. Karst.). *Plant Physiol* 90: 1310-1315
- Potvin C, Charest C** (1991) Maternal effects of temperature on metabolism in the C<sub>4</sub> weed *Echinochloa crus-galli*. *Ecology* 72: 1973-1979
- Pretzsch H, Dursky J** (2002) Growth reaction of Norway Spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) and European beech (*Fagus silvatica* L.) to possible chlimatic changes in Germany. A sensitivity study. *Forstwissenschaftliches Centralblatt* 121 Supplement 1: 145-154
- Pritchard FM, Eagles AB HA, Norton RM, Salisbury PA, Nicolas C M** (2000) Environmental effects on seed composition of Victorian canola. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 40: 679-685
- Pritchard FM, Norton RM, Eagles HA, Salisbury PA, Nicolas CM** (1999) The effect of environment on Victorian Canola quality. Proceedings of the 10<sup>th</sup> international Rapeseed Congress, Canberra, Australia.
- Provart NJ, Gil P, Chen W, Han B, Chang HS, Wang, Zhu T** (2003) Gene expression phenotypes of *Arabidopsis* associated with sensitivity to low temperatures. *Plant Physiol* 132: 893-906

- Pütter J** (1970) Peroxydase. In: Bergmeyer H (ed) Methoden der enzymatischen Analysen. Verlag Chemie, Weinheim pp 648-653
- Rahoutei J, Garcia-Luque I, Barón M** (2000) Inhibition of photosynthesis by viral infection: Effect on PSII structure and function. *Physiol Plant* 110: 286-292
- Rapp J** (2000) Konzeption, Problematik und Ergebnisse klimatologischer Trendanalysen für Europa und Deutschland. *Berichte des Deutschen Wetterdienstes* 212, Selbstverlag des Deutschen Wetterdienstes, Offenbach/Main
- Ray H, Yu M, Auser P, Blahut-Beatty L, McKersie B, Bowley S, Westcott N, Coulman B, Lloyd A, Gruber MY** (2003) Expression of anthocyanins and proanthocyanins after transformation of alfalfa with maize Lc. *Plant Physiol* 132: 1448-1463
- Reik W, Walter J** (2001) Genomic imprinting: parental influence on the genome. *Nature reviews/genetics* 2: 21-32
- Richard S, Morency MJ, Drevet C, Jouanin L, Séguin A** (2000) Isolation and characterisation of a dehydrin gene from white spruce induced upon wounding, drought and cold stresses. *Plant Mol Biol* 43: 1-10
- Richards EJ** (1997) DNA methylation and plant development. *Trends in Genetics* 13:319-323
- Riechmann JL, Meyerowitz EM** (1998) The AP2/EREBP family of plant transcription factors. *Biol Chem.* 379:633-648
- Rizza F, Pagani D, Stanca AM, Cattivelli** (2001) Use of chlorophyll fluorescence to evaluate the cold acclimation and freezing tolerance of winter and spring oats. *Plant Breeding* 120: 389-396
- Roach DA, Wulff RD** (1987) Maternal effects in plants. *Annual review of ecology and systematics* 18:209-235
- Rohacek K** (2002) Chlorophyll fluorescence parameters: the definitions, photosynthetic meaning, and mutual relationships. *Photosynth* 40: 13-29
- Rose JKC, Bashir S, Giovannoni JJ, Jahn MM, Subramanian Saravanan R** (2004) Tackling the plant proteome: practical approaches, hurdles and experimental tools. *The Plant Journal* 39: 715-733
- Rose R, Haase D** (2002) Chlorophyll fluorescence and variation in tissue cold hardiness in response to freezing stress in Douglas-fir seedlings. *New Forests* 23: 81-96
- Rossiter MC** (1996) Incidence and consequences of inherited environmental effects. *Annu Rev Ecol Syst* 27: 451-476
- Rothe M, Krabel D, Roloff A** (1999) Responses of Norway spruce (*Picea abies* [L.] Karst.) to water deficiency. *Phyton-Annales Rei Botanicae* 39: 183-190
- Rubio MC, Gonzales EM, Minchin FR, Webb KJ, Arrese-Igor C, Ramos J, Becana M** (2002) Effects of water stress on antioxidant enzymes of leaves and nodules to transgenic alfalfa overexpressing superoxide dismutase. *Physiol Plant* 115: 531-540
- Salekdeh GH, Siopongco J, Wade LJ, Ghareyazie B, Bennett J** (2002a) A proteomic approach to analysing drought- and salt responsiveness in rice. *Field crops research* 76: 199-219
- Salekdeh GH, Siopongco J, Wade LJ, Ghareyazie B, Bennett J** (2002b) Proteomic analysis of rice leaves during drought stress and recovery. *Proteomics* 2: 1131-1145
- Salome PA, Robertson McClung C** (2005) Pseudo-response regulator 7 and 9 are partially redundant genes essential for the temperature responsiveness of the *Arabidopsis* circadian clock. *Plant Cell* 1-13
- Savitch LV, Barker-Astrom, Ivanov AG, Hurry, Öuqist G, Huner NPA, Gardestöm P** (2001) Cold acclimation of *Arabidopsis thaliana* results in incomplete recovery of photosynthetic capacity, associated with an increased reduction to the chloroplast stroma. *Planta* 214: 295-303

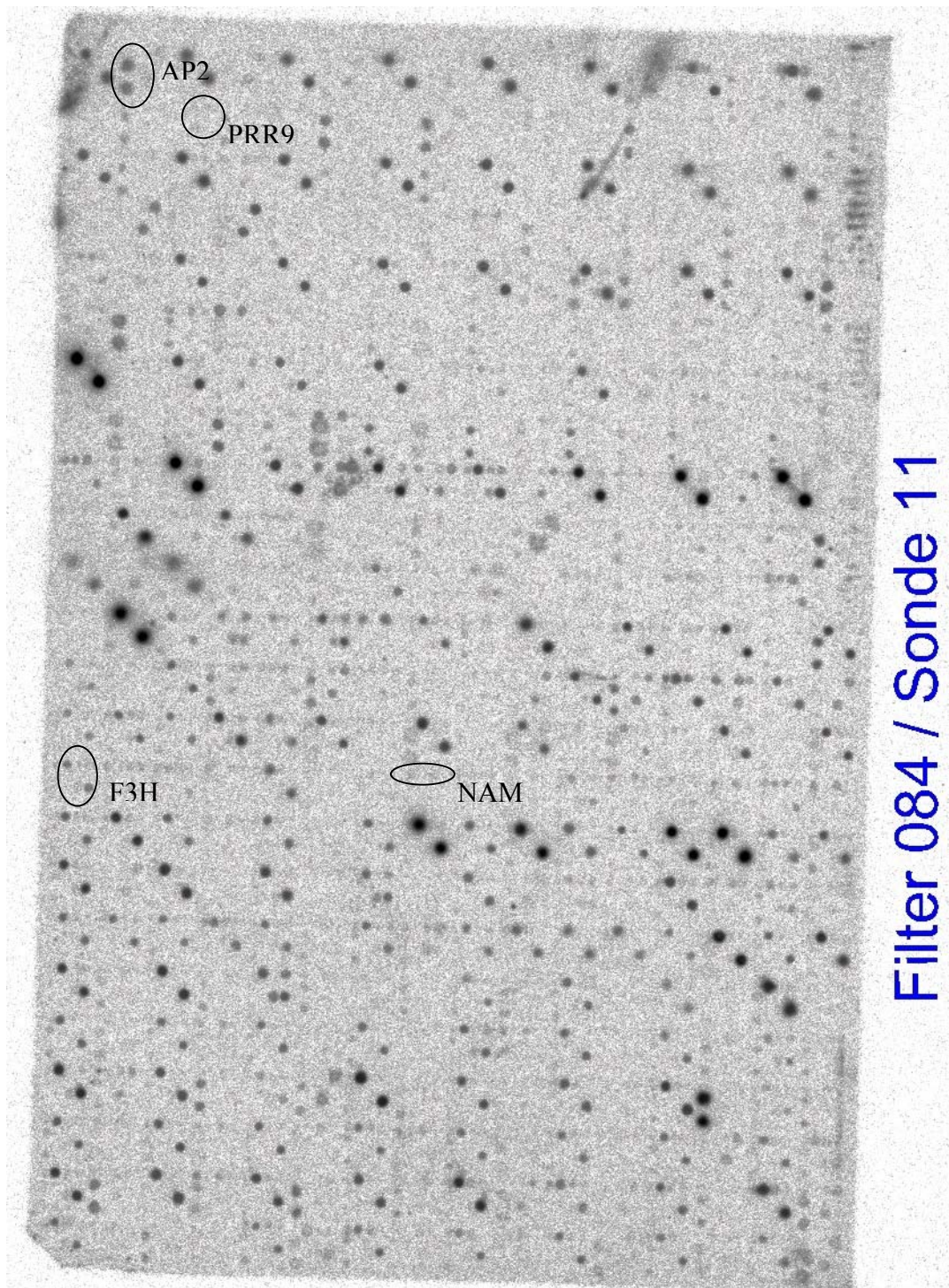
- Saxe H, Cannell MGR, Johnsen O, Ryan MG, Vourlitis G** (2001) Tree and forest functioning in response to global warming. *New phytologist* 149: 369-400
- Schmidt-Vogt H** (1977) Die Fichte. Band I. Taxonomische-Verbreitung-Morphologie-Ökologie-Waldgesellschaften. Paul Parey, Hamburg, Berlin.
- Scholander PF, Hammel HT, Bradstreet ED, Hemmingsen EA** (1965) Sap pressure in vascular plant. *Science* 148: 339-346
- Schönwiese CD** (2003) Mit welchen Klimaveränderungen müssen wir rechnen?, Vortrag Kolloquium: „Elbeflut 2002-Ein Menetekel?“, Deutsche Gesellschaft Club of Rom, Hamburg 13 Juni 2003
- Schopfer P** (1989) Experimentelle Pflanzenphysiologie. Band 2: Einführung in die Anwendungen. Springer Verlag, Berlin, pp 39-50
- Schütt P, Schuck HJ, Stimm B** (1992) Lexikon der Forstbotanik: Baum- und Straucharten, Waldpflanzen, Mikroorganismen, Ökosysteme. 1. Aufl. Ecomed, Landsberg/Lech
- Schwanz P, Polle A** (2001) Differential stress response of antioxidative systems to drought in pedunculate oak (*Quercus robur*) and maritime pine (*Pinus pinaster*) grown under high CO<sub>2</sub> concentration. *J Exp Bot* 52: 133-143
- Schwanz P, Häberle KH, Polle A** (1996) Interactive effects of elevated CO<sub>2</sub>, Ozone and drought stress in the activities of antioxidative enzymes in needles of Norway spruce tress (*Picea abies*, [L.] Karsten) grown with luxurios N-supply. *J Plant Physiol* 148: 351-355
- Schweizer CJ, Ries SK** (1969) Protein content of seed: increase improves growth and yield. *Sience* 165: 73-75
- Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K, Seki M** (2003) Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress response. *Curr Opin Plant Biol* 6: 410-417
- Skre O, Nes K** (1993) Combined effects of elevated winter temperatures and CO<sub>2</sub> on Norway spruce seedlings. *Silva Fennica* 30 (2-3) 135-143
- Skrøppa T, Johnsen Ø** (2000) Patterns of adaptive genetic variation in forest tress species; the reproductive environment as an evolutionary force in *Picea abies*. In: Forest Genetics and Sustainability. Matyas C (ed.), Kluwer Academic Publishers, Niederlande
- Skrøppa T** (1991) Within-population variation in autumn frost hardiness and its relationship to bud-set and heigth growth in *Picea abies*. *Scand J For Res* 6: 353-363
- Sommerville C, Koorneef M** (2002) Timeline: A fortunate choice-the history of Arabidopsis as a model plant. *Nature Reviews Genetics* 3 (11): 883-889
- Somerville CR, Meyerowitz EM** (1994) Introduction. In: Arabidopsis. Meyerowitz EM, Somerville CR (eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA
- Souer E, van Houwelingen A, Kloos D, Mol J, Koes R** (1996) The no apical meristem gene of petunia is required for pattern formation in embryos and flowers and is expressed at meristem and primordia boundaries. *Cell* 85: 159-170
- Spreitzer RJ** (2002) RUBISCO: Structure, Regulatory Interactions, and Possibilities for a better enzyme. *Annual Rev Plant Biol* 53: 449-475.
- Sutinen LM, Arora R, Wisniewsky M, Aschworth E, Strimbeck R, Palta J** (2001) Mechanisms of frost survival and freeze-damage in nature. In: Conifer cold hardiness. Bigras FJ, Colombo SJ (eds.), Kluwer Academic Publishers, Netherland, pp. 89-120
- Takac T** (2004) The relationship of antioxidant enzymes and some physiological parameters in maize during chilling. *Plant Soil Environ* 50: 27-32
- Tausz M, Wonisch A, Peters J, Jimenez MS, Morales D, Grill** (2001) Short-term changes in free redical scavengers and chloroplast pigments in *Pinus canariensis* needles as affected by mild drought stress. *J Plant Physiol* 158: 213-219

- Thiellement H, Zivy M, Plomion C** (2002) Combining proteomic and genetic studies in plants. *Journal of Chromatography B*, 782: 137-149
- Thomashow MF** (1999) Plant cold acclimation: Freezing tolerant genes and regulatory mechanisms. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 50: 517-599
- Tuskan GA, DiFazio SP, Teichmann T** (2003) Poplar genomics is getting popular: The impact of the poplar genome project on tree research. *Plant Biology* 5: 1-3
- Tyystjärvi E, Riikonen M, Arisi A-CM, Kettunen R, Jouanin L, Foyer CH** (1999) Photoinhibition of photosystem II in tobacco plants overexpressing glutathione reductase and poplars overexpressing superoxide dismutase. *Physiol Plant* 105: 409-416
- van Heerden PDR, Krüger GHJ** (2000) Photosynthetic limitations in soybean during cold stress. *South African Journal of Science* 96: 201-206
- van Zandt PA, Mopper S** (2004) The effects of maternal salinity and seed environment on germination and growth in *Iris hexagona*. *Evolutionary Ecology and Research* 6: 813-832
- Wang WX, Vinocur B, Altman A** (2003) Plant response to drought, salinity and extreme temperatures towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta* 218: 1-14
- Watkinson JI, Sioson AA, Vasquez-Robinet C, Shukla M, Kumar D, Ellis M, Heath LS, Ramakrishnan N, Chevonne B, Watson L, van Zyl L, Egertsdotter U, Sederoff RR, Grene R** (2003) Photosynthetic acclimation is reflected in specific patterns of gene expression in drought stressed Loblolly Pine. *Plant Physiol* 133: 1702-1716
- Wolfe Bianchi M, Damerval C, Vartanian N** (2002) Identification of proteins regulated by cross-talk between drought and hormone pathways in Arabidopsis wild-type and auxin-insensitive mutants, *axr1* and *axr2*. *Funct Plant Biol* 29: 55-61
- Wulff RD** (1995) Environmental maternal effects on seed quality and germination. In: Seed development and germination. Kigel J, Galili G (eds.) pp 491-505, Marcel Dekker New York
- Wulff RD, Caceres A, Schmitt J** (1994) Seed and seedling responses to maternal and offspring environments in *Plantago lanceolata*. *Functional ecology* 8: 763-769
- Wulff RD** (1986 a) Seed size variation in *Desmodium paniculatum*: I. Factors affecting seed size. *Journal of Ecology* 74: 87-97
- Wulff RD** (1986 b) Seed size variation in *Desmodium paniculatum*: II Effects on seedling growth and physiological performance. *Journal of Ecology* 74: 99-114
- Wullschlegel SD, Janson S, Taylor G** (2002) Genomics and forest biology: Populus emerges as the perennial favorite. *Plant Cell* 14: 2651-2655
- Yamaguchi-Schinozaki K, Kasuga M, Quiang L, Nakashima K, Sakuma Y, Abe H, Shinwari ZK, Motoaki S and Schinozaki K** (2002) Biological mechanisms of drought stress response. JIRCAS Working report pp 1-8
- Yordanov I, Velikova V, Tsonev T** (2000) Plant response to drought, acclimation, and stress tolerance. *Photosynth* 38: 1771-186
- Zang J, Kirkham MB** (1994) Drought-stress-induced changes in activities of superoxide dismutase, catalase, peroxidase in wheat species. *Plant Cell Physiol* 35: 785-791

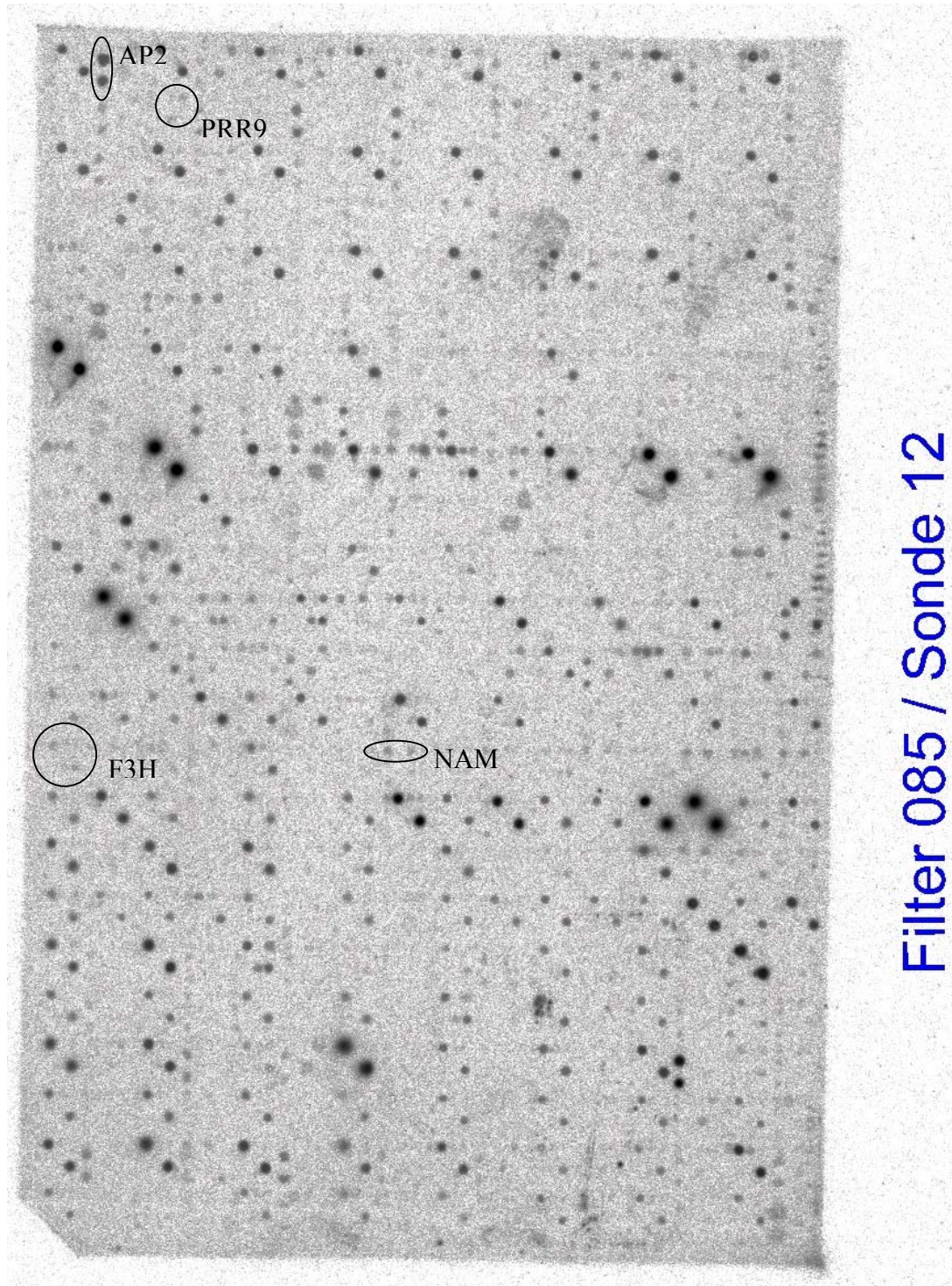


## 8 Anhang

**Abbildung 39** Expression einzelner Gene nach Filterhybridisierung mit Probe von Nachkommen aus kalter Kreuzungsumgebung. Die Filter lagen 24 h auf. Kreis kennzeichnen die vier Gene, die in der Real Time PCR verwendet wurden.



**Abbildung 40** Expression einzelner Gene nach Filterhybridisierung mit Probe von Nachkommen aus warmer Kreuzungsumgebung. Die Filter lagen 24 h auf. Kreis kennzeichnen die vier Gene, die in der Real Time PCR verwendet wurden.



## **Danksagung**

Ich möchte mich als erstes bei meiner „Doktormutter“ Frau Prof. Polle für die gute Betreuung während der Promotionszeit, für die hilfreichen Anregungen zur Gestaltung von Postern, Publikationen und dieser Arbeit bedanken. Gleichzeitig möchte ich mich auch bei meiner eigenen Mutter und meiner Schwester bedanken, die mich in dieser Zeit oft mit Worten und Gesten immer wieder ermutigt und aufgebaut haben.

Ich bedanke mich bei der EU für die finanzielle Unterstützung im Rahmen des Projektes „Adaptability“ (QLK 5-CT-2000-00349). An dieser Stelle möchte ich nochmals Barbara Vornam für die gute Zusammenarbeit im Rahmen dieses Projektes danken. Nicht unerwähnt möchte ich dabei unsere norwegischen Projektpartner Oystein Johnsen und Torre Skroppa lassen, die einmal für das Pflanzenmaterial sorgten und bei Frage und Hilferufen immer zur Verfügung standen. Allen anderen Projektpartnern danke ich für die gute Zusammenarbeit.

Was wäre ein Wissenschaftler ohne technisches Personal?! Ich danke Thomas Klein, der mir bei der Ernte geholfen hat, mir im letzten Moment die Real-Time-PCR Daten ermittelt hat und mich auch sonst mit Material aus den unerschöpflichen Ressourcen des LARI versorgt hat. Ich bedanke mich bei Mojtaba Zomorodi, Andrzej Majcherczyk und Ravi Dwivedi für die Hilfe bei der zweidimensionalen Elektrophorese. Weiter danke ich Gisbert Langner-Kettner, Christine Kettner, Merle Fastenrath, Monika Franke-Klein, Lena Dathe und Theres Riemekasten für deren Hilfe. Besonders möchte ich noch Marianne Smiatacz und Wilfried Dohrmann erwähnen, die mir bei dem Topfen der Fichten bzw. von Arabidopsis geholfen haben. Ein Dank geht auch an Berd Kopka für die Lösung der vielfältigen Computerprobleme. Ich bedanke mich weiterhin bei den Mitarbeitern der AG Gatz und der AG Feußner bei deren Hilfe zur Filterhybridisierung bzw. Fettsäureanalyse.

Ganz besonders möchte ich mich bei Tanja Ducic bedanken, die mir eine liebe Zimmergenossin und Kollegin war. Ich danke Eric Ottow, Udo Junghans, Gerlind Fiebelkorn, Anette Naumann und Thomas Teichmann, die nette und hilfreiche Kollegen waren. Ich danke Ursula Kües, Ev Kretschmar und Monica Navarro für die gute und prägende Zusammenarbeit als Frauenbeauftragte. Ein großer Dank geht an Linda Maack, für die schnelle und unbürokratische Versorgung mit Literatur. Allen anderen nicht namentlich erwähnten danke ich für die angenehme und vor allen Dingen internationale Atmosphäre, die am Institut herrschte



## Lebenslauf

Geburtsdatum	11.03.1977
Geburtsort	Apolda
Nationalität	deutsch
Familienstand	ledig
<b>schulische Ausbildung</b>	
1983-1991	POS Niedertrebra
1991-1995	Gymnasium Bergschule Apolda
<b>universitäre Ausbildung</b>	
10/1995-6/1998	Friedrich Schiller Universität Jena Grundstudium in Biologie mit Vordiplom abgeschlossen
10/1998-3/2002	Universität Potsdam Hauptstudium Biologie (Biochemie/Physiologie) mit Diplom abgeschlossen Thema der Diplomarbeit: „Cadmium- und Zinkwirkung auf den Stoffwechsel junger Maispflanzen.“ (Prof. Gzik)
05/2002-08/2005	Wissenschaftliche Mitarbeiterin (Doktorandin) am Institut für Forstbotanik (Abteilung Baumphysiologie) der Georg August Universität Göttingen Thema der Doktorarbeit: „Einfluss der Kreuzungsumgebung auf die Stressresistenz der Nachkommen von Fichte ( <i>Picea abies</i> L. [Karst.] und <i>Arabidopsis thaliana</i> (L.) Heynh.“ (Prof. Polle)
<b>Praktika im In- und Ausland</b>	
10/1997-12/1997	Praktikum bei Sea Watch Foundation Oxford
02/1998-03/1998	Praktikum Nordseemuseum Bremerhaven
04/1998	Praktikum Deutsches Museum für Meereskunde und Fischerei Stralsund
07/1999-08/1999	Praktikum in einem milchverarbeitenden Betrieb (Dukat) in Zagreb über die IAESTE
03/2000	Praktikum im Referat für Presse, Öffentlichkeits- und Kulturarbeit der Universität Potsdam
Sprachkenntnisse	Englisch (auch Fachenglisch), Spanisch (Grundkenntnisse)



