

Kälte und Pflanze: Updating classical views

Jens Hansen und Erwin Beck

Vortrag, gehalten am 27. Mai 1998

Inhalt

Einleitung

Kälte und Frost stressen die Pflanze auf verschiedene Weise

Wie mißt man Frostschäden und was kann man aus diesen Messungen über die Schäden lernen?

Membranen werden in mehrfacher Weise vom Frost beansprucht

Die extrazelluläre Eisbildung ist noch unverstanden

Das Ausmaß der Gefrierentwässerung ist enorm

Der Einfluß der Zellwand auf die Gefrierentwässerung ist umstritten

Gefrierschutzmittel: Es gibt viele Arten von kryoprotektiven Stoffen

- Niedermolekulare Kryoprotektiva
- "Cold-related proteins"

Signale und Signaltransduktion der Frosthärtung

Gefriertoleranz kostet Effizienz, die Unterkühlungsstrategie ist riskant

Schlußbemerkung

Einleitung

Über keinen anderen Umweltfaktor haben Pflanzenwissenschaftler soviel geforscht und geschrieben wie über die Kälte. Dies verwundert auch nicht, wenn man bedenkt welche wirtschaftlichen Schäden Spätfröste im fortgeschrittenen Frühjahr oder Frühfröste zur Erntezeit verursachen oder wie verheerend Blizzards in den südlichen USA ganze Obstplantagen zu Tode frieren. Das Ziel, frostharte Nutzpflanzen zu züchten, wurde schon frühzeitig in Angriff genommen, aber die Fortschritte waren und sind sehr langsam. Man mußte erkennen, daß Frosthärte nicht eine auf einem oder nur wenigen Genen beruhende Eigenschaft ist, sondern ein multifaktorielles Syndrom, das den ganzen Organismus ergreift, allerdings nicht in all seinen Organen in gleicher Weise. Die unterschiedliche Kälte- oder Frostempfindlichkeit der einzelnen Organe einer Pflanze hat LARCHER (1994) in anschaulicher Weise dargestellt. Vielfach sind die Teilungsgewebe einer Pflanze, z.B. der Sproßvegetationspunkt oder das Kambium am empfindlichsten; es gibt jedoch Zeiten im Jahreslauf, wo solche Gewebe, wie eben das Kambium zu den unempfindlichsten zählen (SAKAI & LARCHER 1987). Ein weiteres Phänomen, das die Erforschung der Frosthärte der Pflanzen auf den ersten Blick erschwert, ist die Tatsache, daß viele Pflanzen den Grad ihrer Frosthärte saisonal verändern, daß sie Frostresistenz entwickeln aber auch verlieren können. So kann man die Nadeln unserer Waldkiefer im Sommer durch Abkühlung auf -10°C letal schädigen,

während sie im Hochwinter selbst -80°C schadlos überstehen (HANSEN & HEIM, unveröffentlicht). Diese zunächst als Komplikation bei der Erforschung aufzufassende Fähigkeit der Pflanzen wird aber zum wissenschaftlichen Vorteil, da es durch sie gelingt, dieselbe Pflanze im frostharten und -empfindlichen Zustand vergleichend zu untersuchen. Allerdings sind Frosthärtung und -enthärtung keine rasch ablaufenden Prozesse, maximale Raten liegen bei der Waldkiefer bei minus $0,8^{\circ}\text{C}$ pro Tag (HANSEN & HEIM, unveröffentlicht). Deshalb lassen sich diese Prozesse auch nicht wie Stoffwechselreaktionen untersuchen, sondern man muß andere, meist umständlichere Methoden anwenden. Bereits aus diesen wenigen Gesichtspunkten wird klar, daß man das Thema Pflanze und Frost sehr differenziert betrachten muß, daß es unzählige Aspekte dabei zu berücksichtigen und zu studieren gibt, und daß Verallgemeinerungen, auch wenn sie noch so plausibel erscheinen, meist doch nicht möglich sind. Natürlich kann man Arten derselben Lebensform und desselben Habitats vergleichen, aber bereits die Übertragung von Vorstellungen bei unterschiedlich frostharten, einander aber sonst ähnlichen Gewächsen kann zu enormen Fehlschlüssen führen. Zum Beispiel ist die Theorie, daß die Eisbildung in einem Pflanzenorgan vom Xylem ausgeht beim Maulbeerbaum zutreffend (KITAURA 1967 zit. in SAKAI & LARCHER 1987), während bei (nordamerikanischen) Kornelkirschen sich das Xylem von allen Geweben am längsten (bis zu -40°C) dem Gefrieren des Wassers widersetzt (BURKE *et al.* 1975).

Die Tatsache, daß die pflanzenphysiologische Erforschung von Frostschäden und Frostresistenz schon seit fast 150 Jahren systematisch betrieben wird, - zu nennen sind hier Namen wie HANS MOLISCH, HERRMANN MÜLLER-THURGAU und JULIUS SACHS, - bringt es zwangsläufig mit sich, daß Vorstellungen, die dem damaligen Erkenntnisstand entstammen, bis in die heutige Zeit hinein wirken, wodurch es manchmal schwer wird, die richtigen Fragen zu stellen. In dem folgenden Beitrag haben wir versucht, zu einzelnen Aspekten, zu denen wir Daten haben oder kennen, in möglichst klarer Weise Stellung zu nehmen. Es liegt auf der Hand, daß wir damit nicht den ganzen Komplex "Frost und Pflanze" erfassen und abhandeln können.

Kälte und Frost stressen die Pflanze auf verschiedene Weise

Lebendes Pflanzengewebe besteht in der Regel zu mehr als 80 % aus Wasser. Deshalb muß man bei der Betrachtung einer Pflanze im Frost nicht nur den Einfluß der tiefen Temperatur auf die biologischen Prozesse untersuchen, sondern auch berücksichtigen, daß die Pflanze durch das Gefrieren von Gewebswasser unter einen erheblichen bis nicht mehr erträglichen Trockenstreß geraten kann. Die unterschiedlichen Effekte von Kälte und Gefrierentwässerung sind in Abb. 1 gegenübergestellt, wobei diese Einflüsse in der Natur natürlich nicht getrennt auf den Organismus einwirken: Gefrier-

entwässerung gibt es nur in der Kälte, aber Kälte oberhalb des Gefrierpunkts führt nicht zur Gefrierentwässerung.

Viele Pflanzen, insbesondere der Tropen und Subtropen, werden bereits durch kühle Temperaturen oberhalb des Gefrierpunktes irreversibel geschädigt (BODNER & LARCHER 1987). Die Schädigungen werden vor allem durch Störungen in der Koordination von Stoffwechselfvorgängen und Veränderungen der intrazellulären Transportvorgänge, aber auch durch temperaturbedingte Veränderungen der Membranfunktionen hervorgerufen (LARCHER 1994).

Ob und in welchem Ausmaß eine Pflanze während eines Frostereignisses Schäden erleidet, hängt von ihrem Entwicklungszustand, der Dauer und Stärke des Frostes sowie der Geschwindigkeit der

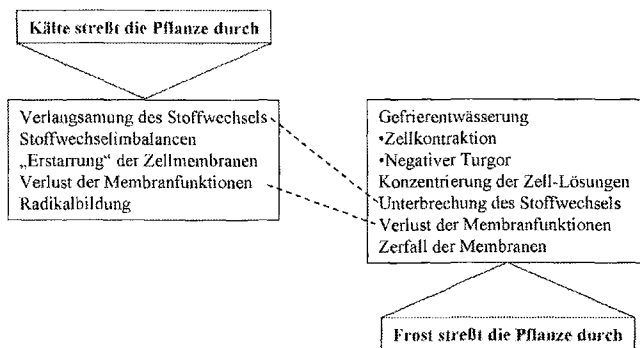


Abb. 1: Strebeffekte durch Kälte und Frost

Temperaturänderung ab. Intrazelluläres Gefrieren der Gewebeflüssigkeit, das im allgemeinen erst unter -10°C spontan einsetzen kann (MAZUR 1977), ist normalerweise wegen der Desintegration der Biomembranen letal. Schnelle Abkühlung und starke Unterkühlung begünstigen dabei die spontane Bildung intrazellulärer Eiskristalle. Allerdings können selbst gefrierempfindliche Gewebe intrazelluläre Eisbildung überleben, wenn die Abkühlung auf sehr tiefe Temperaturen (und die Wiedererwärmung) mit extrem hoher Geschwindigkeit (10.000 K min^{-1}) erfolgt (LUYET & THOENNES 1938, SAKAI *et al.* 1968). In diesem Fall liegt das entstandene Eis in submikroskopischen Kristallen vor, die keinen destruktiven Einfluß auf die zellulären Membranen ausüben (siehe LEVITT 1980). Methoden der ultraschnellen Abkühlung und Wiedererwärmung werden erfolgreich zur Lebendkonservierung und Langzeitlagerung der verschiedensten Organismen und Gewebe eingesetzt.

Gefrierempfindliche Zellen erleiden bei Frostwirkung in dem Moment Schaden, in dem eine umfangreiche Eisbildung im Gewebe einsetzt (LARCHER & NAGELE 1985). Eine starke Unterkühlung der Gewebeflüssigkeit stellt zwar einen metastabilen Zustand dar, kann aber in verschiedenen Pflanzen, insbesondere in Knospenmeristemen und in Xylemparenchymzellen temperater Holzgewächse über lange Zeit stabil bleiben (BURKE *et al.* 1975). Verschiedene mediterrane Holzgewächse und sogar manche tropischen Pflanzen können so Frostereig-

nisse bis -20°C und darunter überstehen (ISHIKAWA 1984). Unterkühlung bietet gefrierempfindlichen Pflanzen zwar einen wirksamen Schutz vor Frosteinfluß, der wenig Adaptation und nur einen relativ geringen Aufwand an Stoffwechsel- und Energieressourcen erfordert, führt aber bei Unterschreitung der artspezifischen Grenztemperatur durch Eisbildung zu meist irreparablen Gewebeschäden.

Im Gegensatz zu gefrierempfindlichen Pflanzen erleiden gefriertolerante Pflanzen erst bei wesentlich niedrigeren Temperaturen, wenn überhaupt, Frostschäden. Die Eisbildung in den Geweben setzt bereits bei wenigen Grad unter dem Gefrierpunkt in den Interzellularräumen ein und die Erhaltung des thermodynamischen Gleichgewichts zwischen extrazellulärem Eis und der Zellflüssigkeit führt bei langsamer Abkühlung zu fortschreitender Entwässerung der Zellen, ein Vorgang, der als Gleichgewichtsfrieren bezeichnet wird. Erst bei Unterschreiten der Toleranzschwelle für die zelluläre Dehydratation setzt eine Schädigung des Gewebes ein.

Aufgrund einer Vielzahl beteiligter Faktoren am Gefrierprozeß läßt sich der frostbedingte Zelltod allerdings nicht auf eine einzige Ursache allein zurückführen. Die Konstitution der Pflanze und der Verlauf des Gefrierprozesses haben einen entscheidenden Einfluß auf die Entstehung von Frostschäden. Störungen der semipermeablen Eigenschaften und Lyse der zellulären Membranen spielen aber eine zentrale Rolle und werden als primäre Ursache von Frostschäden angesehen.

Wie mißt man Frostschäden und was kann man aus diesen Messungen über die Schäden lernen?

Da Frost die Pflanze in vielfacher Weise streßt, gibt es auch viele Meßmethoden, um Frostschäden an einer Pflanze festzustellen und zu quantifizieren. Die meisten Verfahren beruhen jedoch auf der membranschädigenden Wirkung von Kälte und Frost. Da diese aber nicht sehr spezifisch ist, braucht man ein standardisiertes Protokoll für die Streßbehandlung (Abb. 2).

Diesem liegt zugrunde, daß Kälte einerseits den Stoffwechsel verlangsamt und andererseits meist nicht so plötzlich hereinbricht wie z.B. Hitze. Man kühlt also die Pflanze, bzw. den Pflanzenteil in einer geeigneten Apparatur langsam ab (1-2 °C pro Stunde), bis zu einer vorbestimmten Minimumtemperatur und beläßt die Probe bei dieser mehrere Stunden lang. Anschließend erwärmt man mit derselben Temperaturrate wie bei der Abkühlung. Die Probe wird dann bei wenigen Graden über Null einen bis mehrere Tage gelagert, um Frostschäden zur Entwicklung zu bringen. Dann wird mit einem der unten skizzierten Tests der Grad der Schädigung bestimmt. Um die 50-Prozent-Schadensschwelle zu ermitteln, muß man mehrere der beschriebenen Gefrier-Auftau-Zyklen ansetzen, mit jeweils tieferer Endtemperatur. Das Verfahren ist also etwas aufwendig. In diesem Zusammenhang soll kurz die immer wieder gestellte Frage angesprochen werden, wann der Schaden gesetzt wird: Beim Einfrieren,

im gefrorenen Zustand oder beim Auftauen? Der Schaden wird natürlich dann gesetzt, wenn die Kälte- oder Frosttoleranz überfordert wird. Dies kann bereits beim Abkühlen, oder aber während des Einwirkens der Minimumtemperatur geschehen. Sichtbar wird der Schaden aber erst nach dem Auftauen oder erst viel später, wenn der Metabolismus wieder in Gang kommt aber die Kompartimentierung zerstört ist. Dieses "Sichtbarwerden" kann sogar Tage dauern, wie z.B. beim Auftreten von Nekrosen. Zeigen 50% der Proben Nekrosen, so ist die angewendete Minimumtemperatur die LT_{50} . Die Feststellung und Auszählung von Nekrosen ist das einfachste Verfahren zur groben Quantifizierung von Membranschäden.

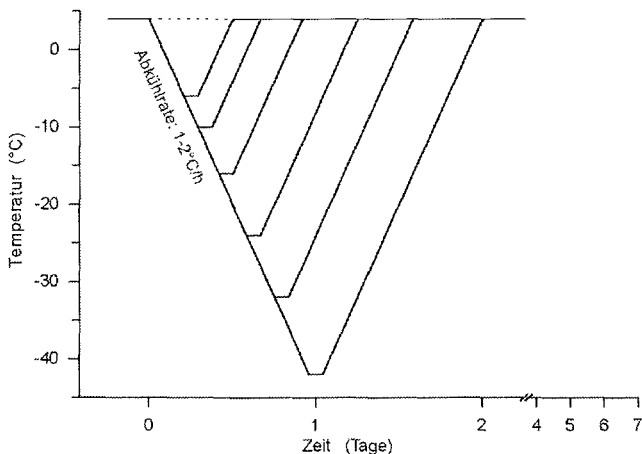


Abb. 2: Zeitlicher Verlauf von Gefrier-Auftau-Zyklen zur Bestimmung der Frosthärte von Pflanzengewebe.

Dem Nekrosentest als einem allgemeinen Verfahren kommt der **Vitalitätstest** z.B. mit Neutralrot prinzipiell nahe. Dieser Farbstoff permeiert in der ungeladenen orangeroten Form in die Zellen und in die Vakuolen, wo dann bei dem etwas saureren pH-Wert des Zellsafts die protonierte purpurrote Form entsteht, die intakte Membranen nicht passieren kann. Neutralrot, das nicht in den Zellen festgehalten wird, sondern aus diesen herausdiffundiert, zeigt die Schädigung an. Die Bestimmung des Prozentsatzes an noch intakten bzw. geschädigten Zellen ergibt den Grad der Schädigung.

In die gleiche Richtung zielt der **Test auf Plasmolysierbarkeit**: Membrangeschädigte Zellen sind nicht mehr plasmolysierbar. Gewebe, das Vakuolenpigmente enthält, eignet sich besonders gut für diesen Test.

Häufig verwendet wird der **Leitfähigkeitstest**, da er keine längere Schadensentwicklungszeit erfordert. Geschädigte Membranen lassen gelöste Stoffe aus dem Protoplasten austreten. Flotiert man Blattscheibchen in destilliertem Wasser, so nimmt dessen Leitfähigkeit bei Membranschädigung über Stunden hinweg zu. Als Kontrolle dient ungeschädigtes bzw. vollständig abgetötetes Blattgewebe (100% Schädigung).

Alle diese Tests quantifizieren Membranschäden und zeigen, daß die Membranen der Angriffspunkt von Kälte oder (Gefrier-)Entwässerung sind, wobei allerdings die verschiedenen Membranen einer Zelle unterschiedlich empfindlich sein dürften. Bei der

Fichte scheint der Tonoplast, bei Eukalyptus das Plasmalemma die empfindlichste Membran zu sein.

Ein anderer weitverbreiteter Test zielt primär nicht auf Membranschäden, sondern auf eine Enzym-Aktivität. Unspezifische Dehydrogenasen oxidieren ein farbloses Tetrazoliumsalz zum rot oder blau gefärbten Formazan, dessen Konzentration photometrisch bestimmt werden kann. Viele Dehydrogenasen sind lösliche Enzyme, viele aber auch membrangebunden. Der **Tetrazolium-Test** zeigt Enzym-inaktivierung an, gleichgültig ob diese direkt oder indirekt (durch Membranschädigung) zustande kommt.

Neben diesen allgemeinen Tests kann man natürlich auch bestimmte **Stoffwechselprozesse als Testsysteme** verwenden, z.B. den photosynthetischen Gaswechsel oder einzelne Komponenten der photosynthetischen Lichtreaktion (die mittels der Chlorophyllfluoreszenzmethode nicht-invasiv erfaßt werden können, VOGG *et al.* 1998a, LICHTENTHALER & MIEHÉ 1997), oder die Dunkelatmung. Bei der Messung dieser Parameter kann man allerdings nicht von vorneherein annehmen, daß es sich um die jeweils kälteempfindlichsten Reaktionen handelt.

Membranen werden in mehrfacher Weise vom Frost beansprucht

Tiefe Temperaturen können direkt oder indirekt auf Biomembranen einwirken. Unter dem Einfluß niedriger Temperaturen kommt es zu einer Abnahme der

Mobilität der Membranlipide in der Lipiddoppelschicht und letztlich zur Kristallisation einzelner Membranlipidspezies. Biomembranen sind hochkomplexe Mischungen verschiedener Lipidkomponenten und verhalten sich daher bei Temperaturänderungen anders als reine Membranlipidfraktionen. Während letztere einen diskreten Übergang zwischen verschiedenen Phasen aufweisen, zeigen Biomembranen Phasenübergänge in einem weiten Temperaturbereich (HOLZER 1996). Die Kristallisation einzelner Membranlipidspezies in einer Biomembran hat lokale Entmischungen der Membranlipide zur Folge und es bilden sich ganze Membranareale, in denen die Lipide nicht mehr flüssig sondern gelartig sind. Die Lipidmoleküle liegen dabei nun in stärker geordneten Strukturen vor, weisen eine dichtere Packung auf und die Membran wird dicker. Dies führt zu einem Funktionsverlust der Membranen; vor allem in den Grenzbereichen zwischen erstarrten und noch flüssig-kristallinen Membrandomänen sind die Membranen nun nicht mehr osmotisch belastbar (WILLIAMS 1990).

Neben der Kälte an sich wirkt auch die Entwässerung der Zellen während des Gefrierens erheblich auf die Membranen ein. Der physikalische Zustand der Biomembranen ist nämlich auch stark von anderen Parametern, wie Ionenstärke, Wasseraktivität und pH-Wert abhängig. Die durch die Entwässerung der Zellen hervorgerufene geringe Aktivität des zellulären Restwassers kann den Übergang der Membranlipide vom Bilayer in die sog. hexagonale

Phase zur Folge haben, was durch die mit dem Volumenverlust einhergehende Zusammenlagerung der zellulären Membransysteme noch gefördert wird. Mit der Umstrukturierung der Membranen in die für die hexagonale Phase typische Röhrenform ist natürlich auch der Verlust der Kompartimentierung verbunden.

Ein erheblicher Einfluß auf die Membranen ergibt sich auch aus der mit der Entwässerung der Zellen einhergehenden Konzentrierung der zellulären Flüssigkeit. Die Akkumulation von Ionen in den zellulären Kompartimenten resultiert in Veränderungen der Ladungsverhältnisse an den Membranen. Gleichzeitig führt die durch tiefe Temperaturen hervorgerufene Verlangsamung bzw. Inaktivierung der Ionenpumpen- und -kanäle (YOSHIDA 1994) zu Ionenumverteilungen und zu Veränderungen des Membranpotentials mit destruktiver Wirkung vor allem auf die Protein-Lipidgrenzflächen.

Membranphysiologische Veränderungen, die im Zuge der Frosthärtung beobachtet wurden, dienen entweder direkt der Bewältigung der durch tiefe Temperaturen hervorgerufenen Veränderungen oder hängen mit sekundären Streißphänomenen zusammen und zielen auf die Erhaltung des fluiden Zustands der Biomembranen. Die bekannteste Veränderung der Biomembranen während der Frosthärtung ist die Desaturation der Lipidkomponenten, wobei während der Biosynthese vermehrt ungesättigte Fettsäuren in die Lipidmoleküle eingebaut werden (SENER & BECK 1982, UEMURA & STEPONKUS 1994).

Weniger bekannt dagegen ist die relative Lipid-anreicherung der Biomembranen: Im Lipidfilm sind in erheblichem Ausmaß intrinsische Proteine inseriert, deren lipophile Domänen mit den sie umgebenden Lipiden wechselwirken und diese in ihrer Beweglichkeit stark einschränken. Membranproteine üben also eine ordnende Kraft auf die sie umgebenden Membranlipide aus, und die Erstarrung der Membranen geht deshalb immer von diesen Proteindomänen aus.

Die Erstarrung von Membranarealen hat ihrerseits Konformationsveränderungen der intrinsischen Membranproteine, verbunden mit einem Verlust ihrer physiologischen Aktivität zur Folge, was letztlich zum Funktionsverlust der gesamten Membran und zur Aufhebung der Kompartimentierung der Zelle führt.

Während des Frosthärtungsprozesses wird eine Abnahme des membranintegralen Proteinanteils gegenüber dem Lipidanteil beobachtet (GARBER & STEPONKUS 1976, SUGAWARA & SAKAI 1978). Die relative Vermehrung der Lipide erfolgt zum einen durch einen vermehrten Einbau von Lipidmolekülen (YOSHIDA & SAKAI 1973) aber auch, wie neuerdings gezeigt werden konnte, durch einen Abbau von Membranproteinen (VOGG *et al.* 1998a, OTTANDER *et al.* 1995). Ein geringerer Proteingehalt der Membranen wirkt dabei einer Immobilisierung von Membranarealen durch Wechselwirkungen mit den integralen Proteinen entgegen (VOGG *et al.* 1998b, Abb. 3).

Beide Prozesse, die Desaturation der Membranlipide und die relative Anreicherung der Lipidkomponenten, sichern den fluiden Zustand der Membranen auch unter dem Einfluß niedriger Temperaturen.

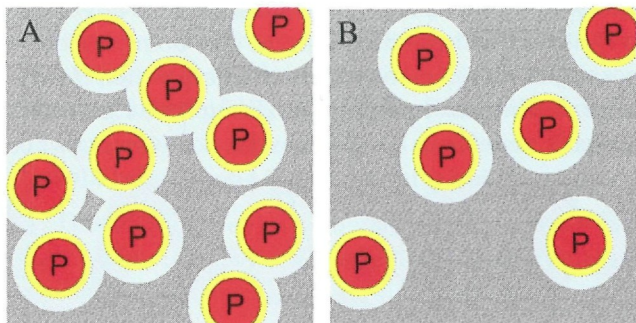


Abb. 3: Modellvorstellung zum Einfluß des Membranproteinabbaus während der Frosthärtung auf die Protein-Lipid-Wechselwirkungen. Schematisch dargestellt ist die Aufsicht auf Membranoberflächen frostempfindlicher (A) und frostharter (B) Zellen. Membranproteine (P) sind bei normaler Temperatur von einer Schicht Lipidmoleküle (gelb) umgeben, deren Beweglichkeit durch Protein-Lipid-Wechselwirkungen eingeschränkt ist. Unter dem Einfluß niedriger Temperaturen ist der Austausch von Lipidmolekülen in der Umgebung der Membranproteine und den Membranbereichen mit freibeweglichen Lipiden (grau) vermindert, so daß mehr Lipidmoleküle durch Wechselwirkungen mit den Proteinen in ihrer Beweglichkeit eingeschränkt werden (blau). Unter dem Einfluß niedriger Temperaturen bilden sich in Membranen frostempfindlicher Zellen (A) großflächig starre und unbewegliche Domänen, während in Membranen frostharter Zellen (B) aufgrund eines niedrigen Protein-/Lipid-Verhältnisses große Membranbereiche mit freibeweglichen Lipidmolekülen erhalten bleiben.

Die extrazelluläre Eisbildung ist noch un- verstanden

Pflanzen können das Gefrieren ihres Gewebswassers nur überleben, wenn die Eisbildung in den Interzellularen und nicht intrazellulär erfolgt. Da sich gefrorenes Gewebe nur schlecht mikroskopieren läßt, sind gute Aufnahmen von Pflanzengewebe mit extrazellulärer Eisdeposition selten. Bei dem in Abb. 4 gezeigten Experiment wurde von gefrorenen *Pachysandra*-Blättern in der Kälte die untere Epidermis entfernt, sodaß nun der Blick in das Schwammgewebe

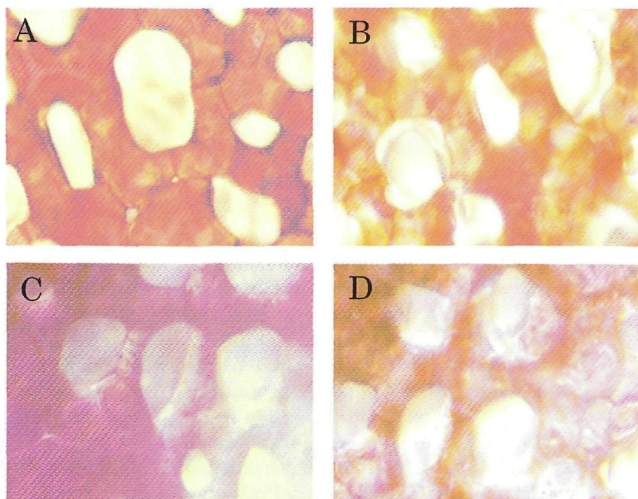


Abb. 4: Schwammparenchymzellen lebender (A, B) und erfrorener (C, D) Blätter von *Pachysandra terminalis* bei Raumtemperatur (A, C) und im gefrorenen Zustand bei -12°C (B, D). Die Vakuolen der Zellen wurden vor dem Experiment mit Neutralrot gefärbt. Im lebenden Gewebe bleibt der Vitalfarbstoff in den Zellen, während im erfrorenen Gewebe Farbstofftröpfchen auch im extrazellulären Eis zu sehen sind.

möglich wird. Man erkennt deutlich die ungefärbten Eiskristalle in den Interzellularräumen. Vor dem Experiment hatten die Blätter über die Blattstiele eine Neutralrot-Lösung aufgenommen. Da die Eiskristalle farblos sind, muß man annehmen, daß der Farbstoff vom Tonoplast und/oder der Plasmamembran in den Zellen zurückgehalten wurde. Anders ist es bei Blättern, die vor dem Gefrierexperiment abgetötet worden waren. Bei diesen zeigen sich kleine Farbtröpfchen auch im extrazellulären Eis, da das zerstörte Plasmalemma nun keine Permeationsbarriere mehr für das Neutralrot darstellt.

Die Theorie des sog. Gleichgewichtsfrierens geht davon aus, daß bei Erreichen der aktuellen Kristallisationstemperatur sich die ersten Eiskristalle in den Interzellularräumen bilden und über diesen Eiskristallen der Wasserdampfdruck kleiner als über der wässrigen Phase der zellulären Lösungen ist. Dadurch wird solange Wasser aus den Zellen herausgesogen - und kristallisiert in den Interzellularräumen - bis die Erniedrigung des Wasser-Dampfdrucks durch das Gefrieren der Erniedrigung durch Konzentrierung der zellulären Lösungen gleichkommt, und damit kein Wasserdampfdruckgefälle mehr zwischen den Interzellularräumen und den Protoplasten besteht; moderner würde man sagen, bis das Wasserpotential des gefrorenen Wassers mit dem Wasserpotential der Zelle identisch ist. Kühlt man das Pflanzenorgan weiter ab, so wird das Wasserpotential des Eises immer größer, d.h. numerisch negativer, und weiteres Zellwasser tritt in den

Interzellularraum über. Welcher Anteil des Gewebswassers beim Gefrieren kristallisiert, hängt also in erster Näherung von der Temperatur und von der Ausgangskonzentration der zellulären Lösungen, also ihrem osmotischen Potential ab. MÜLLER-THURGAU hat in seiner Arbeit über das Gefrieren und den Gefriertod der Pflanzen 1886 erstmals die Abhängigkeit des Ausmaßes der Gefrierentwässerung von Apfel- und Kartoffelgewebe bei unterschiedlichen Frosttemperaturen gezeigt.

In unzähligen Experimenten wurden der Gefrierpunkt von Blättern, Wurzeln und allen möglichen Pflanzengeweben bestimmt. Er ist an dem bei der Kristallisation entstehenden Wärmepuls, der sogenannten Gefrierexotherme, erkennbar. Das Ausmaß dieser Exotherme hängt natürlich davon ab, wieviel Wasser kristallisiert. Bei einem kleinen Volumen ist die plötzliche Wärmeentwicklung nur mit differentieller Thermalanalyse (elektrische Verstärkung zwischen einer Referenztemperatur und dem gefrierenden Pflanzenteil) meßbar, bei größeren Volumina kann man die Exotherme auch mit empfindlichen Temperaturfühlern direkt im Freiland messen (Abb. 5, BECK *et al.* 1984).

Über die Bedeutung der Gefrierexotherme ist viel diskutiert worden. Ihre Auslösetemperatur scheint von vielen, darunter auch zufälligen Faktoren abhängig zu sein, z.B. davon, ob sich auf dem Blatt noch Wassertropfen befinden (die zuerst gefrieren), ob das Blatt von Wind bewegt wird, wie die Abkühlgeschwindigkeit ist, u.a.m.. Mehr Bedeutung dürfte

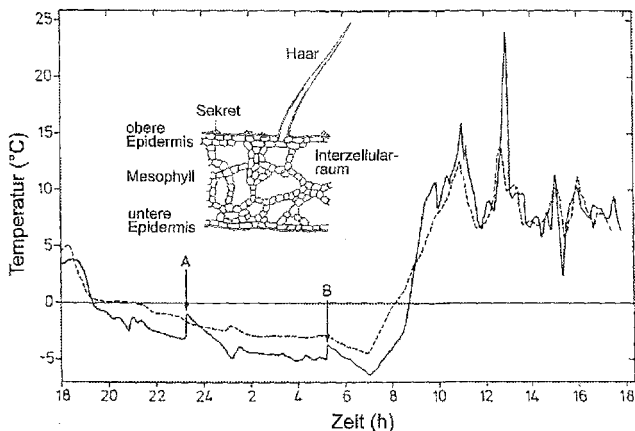


Abb. 5: Zeitlicher Verlauf der Blatttemperatur der Riesenrosettenpflanze *Senecio keniodendron* im Vergleich zur Lufttemperatur (Teleki-Tal, Mt. Kenya). Die Gefrierexotherme A resultiert aus dem Gefrieren an der Blattoberfläche befindlicher Wassertropfen, B aus dem Gefrieren von Wasser in den Interzellularräumen (siehe Einschub).

schon der Frage zukommen, ob eine oder mehrere Gefrierexothermen beobachtet werden. Dies würde auf unterschiedlich gefrierende Wasserkompartimente in einem Organ hindeuten, z.B. auf Wasser in den Leitbahnen und in den Parenchyemen (LARCHER 1985). In der Regel beobachtet man jedoch nur eine Exotherme, die das initiale Gefrieren anzeigt.

Wenn soviel Wasser in den Interzellularen ist, daß bei dessen Erstarren ein meßbarer Wärmepuls noch an der Blattoberfläche auftritt, muß dieses vor dem Gefrieren aus den Zellen in die Interzellularräume ausgetreten sein, denn diese Räume müssen

im assimilierenden Blatt für die Diffusion von CO_2 und O_2 offen bleiben: Eindringen von Flüssigkeit in die Interzellularen zeigt deshalb immer eine Funktionsstörung an. Tatsächlich kann man bei verschiedenen Blättern den Flüssigkeitseintritt in die Interzellularen bei Temperaturen knapp über 0°C am glasigen Aussehen feststellen. Dies ist das Gewebswasser, dessen Gefrieren die Exotherme anzeigt. Wie kommt es aber zum Wasseraustritt aus den Zellen noch oberhalb des Gefrierpunkts? Der Vorgang erinnert im Prinzip an den Wasseraustritt im Flexorgewebe eines Blattgelenks. Hier, so sagen die Lehrbücher, folgt das Wasser einem durch ein Aktionspotential verursachten (oder dieses verursachenden) Ionen-, vor allem K^+ -Austritt aus dem Protoplasten. Ob dieser Vorgang noch durch die Kontraktion des Cytoskeletts unterstützt wird, spielt hier keine Rolle. Entsprechende Experimente mit gefrierhartem Blattgewebe zeigen ebenfalls einen massiven Ionenaustritt aus den Zellen noch oberhalb des Gefrierpunkts an, was notwendigerweise einen Wasseraustritt und den Turgorverlust nach sich ziehen muß. Die Annahme liegt nahe, daß mit der Temperaturannäherung an den Gefrierpunkt Ionenpumpen in der Plasmamembran und wohl auch im Tonoplasten inaktiviert werden und die Ionen dann in den Apoplasten übertreten (Abb. 6, SCHEIBE & BECK 1990).

Was durch Leitfähigkeitsmessung für elektrisch geladene Teilchen leicht nachweisbar ist, kann bei Felduntersuchungen für nicht geladene Solute nicht überprüft werden. Man kann aber nicht ausschließen,

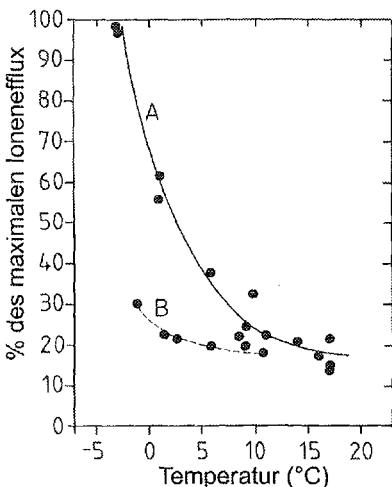


Abb. 6: Temperaturabhängige Freisetzung geladener Komponenten aus Blattscheiben von im Habitat wachsenden (A, Teleki-Tal, Mt. Kenya) und im Gewächshaus angezogenen (B, Bot. Garten Bayreuth) Riesenrosettenpflanzen *Senecio keniodendron*.

daß auch solche, z.B. Saccharose und andere Zucker ebenfalls in den Apoplasten übertreten, soweit sie durch einen energieverbrauchenden Prozeß im Protoplasten angereichert vorliegen. Dies kann man auch daraus schließen, daß der energieabhängige Export dieser Zucker in der Kälte wesentlich langsamer, wenn überhaupt erfolgt, was sowohl für *Senecio* als auch für die Kiefer gezeigt wurde (SCHEIBE & BECK 1990, HANSEN & BECK 1994). Nehmen wir also an, daß durch Kälteinaktivierung von Transportern der Turgor zusammenbricht und der Wanddruck solange Wasser bzw. zelluläre Flüssigkeit

auspreßt, bis er selbst Null geworden ist. Dann wären die Interzellularen zumindest teilweise mit soviel wässriger Flüssigkeit gefüllt, daß bei entsprechender Unterkühlung nennenswerte Eisbildung auftreten kann.

Die theoretische Lösung des einen Problems, wie genügend Wasser in die Interzellularen kommt, um beim Gefrieren einen meßbaren Wärmepuls zu erzeugen, stellt uns nun aber vor ein neues Problem: Warum gefriert die Lösung im Interzellularraum und die im Protoplasten nicht? Früher nahm man an, daß nur reines Wasser aus der Zelle austritt, das einen höheren Gefrierpunkt als die zellulären Lösungen hat. Dies können wir nun nicht mehr behaupten. Um eine zumindest theoretische Erklärung anbieten zu können, müssen wir den Kristallisationsprozeß etwas genauer betrachten. Warum muß man eigentlich Wasser unterkühlen, damit es kristallisiert? Im Experiment bedeutet unterkühlen, daß man Energie aufwenden muß, um die Temperatur abzusenken. Diese Energie könnte man sich sparen, wenn das Wasser sogleich beim Erreichen der 0°-Temperatur kristallisieren würde. Die für die Unterkühlung nötige Energie kann beträchtlich sein. So ist es möglich, unter Anwendung aller möglichen Vorsichtsmaßnahmen einen Wassertropfen bis auf fast - 40°C abzukühlen bevor Eiskeimbildung auftritt. Man nennt dies die **homogene Nukleation**. In den sehr engen Xylemelementen der Pflanzen wurden Unterkühlungstemperaturen von bis zu -40°C ermittelt (BURKE *et al.* 1975). Die homogene Nukleation

erfordert deshalb eine so tiefe Temperatur, weil die Bewegung der Wassercluster soweit zur Ruhe kommen muß, daß ein Kristallgitter gebildet werden kann. Zur Kristallisation bereite, "beruhigte" Wassercluster von vergleichsweise geringer Größe (ca. 190 Wassermoleküle) nennt man "kritische Embryos". In diesen können die Wasserdipole die maximale Zahl von 4 Wasserstoffbrücken zu benachbarten Molekülen ausbilden, eine Voraussetzung für die Erstarrung.

Die bei der homogenen Nukleation durch Kälte erzwungene Ordnung kann aber auch durch hydrophile Oberflächenstrukturen bereits bei höheren Temperaturen hervorgerufen werden. Wenn solche Strukturen den Wassermolekülen in etwa die Gitterpunkte des Eiskristallgitters vorgeben, ist die Unterkühlung, bei der die Nukleation erfolgt, wesentlich geringer. Im Idealfall reichen 2-3°C unter den eigentlichen Gefrierpunkt aus, um die Kristallisation auszulösen. Die durch solche Strukturen oder durch Animpfen ausgelöste Kristallisation bei nur wenigen Minusgraden bezeichnet man als **heterogene Nukleation**.

Experimentell ist es sehr schwierig, an solche molekularen Strukturen heranzukommen. Man kennt Pflanzen, bei denen die Nukleation schon bei wenigen Frostgraden ausgelöst wird. Beispiele sind Wintergetreide, *Veronica persica* und *Buxus microphyllus* (KAKU 1973) oder *Prunus* (GROSS *et al.* 1988). Über definierte Oberflächenstrukturen pflanzlicher Zellwände, die nukleationsaktiv sind, d.h. die

Kristallbildung schon bei relativ geringen Frosttemperaturen auslösen, ist bis jetzt kaum etwas bekannt. Extrakte der inneren Oberflächen (Interzellularräume) dieser Pflanzen enthalten besondere Proteine, die bei der Frosthärtung gebildet werden.

Wesentlich besser untersucht als nukleationsaktive Pflanzenoberflächen sind Eisbildung auslösende Bakterien, die gewöhnlich auf Pflanzenoberflächen (und in den Interzellularen) leben. Bei diesen sogenannten INA-Bakterien (*Ice nucleation active bacteria*) handelt es sich um Stämme weitverbreiteter Arten wie z.B. *Pseudomonas syringae* oder *P. fluorescens* (Abb. 7). Die Nukleationsaktivität läßt sich, wenigstens teilweise auf Proteine zurückführen, die sogenannten **Ice nucleating proteins** (ICPs). Bei einem ICP aus *Pseudomonas syringae* ist die Aminosäuresequenz bekannt (GREEN & WARREN 1985): In diesem Polypeptid wiederholt sich ein Octopeptid 122mal. Deletionsmutanten zeigen, daß eine 68-fache Wiederholung des Motivs für die Nukleationsauslösung ausreicht. Verändert man die 8er-Periodizität durch ortsspezifische Mutagenese, so geht die Nukleationsaktivität sofort verloren. Nach jeweils 6 Octopeptiden ist 1 Aminosäure ausgetauscht; die so entstehende 6er-Periodizität entspricht der hexagonalen Anordnung der Wassermoleküle im Eiskristall und könnte damit eine bestimmte Ordnung der umgebenden Wassermoleküle erzwingen. Allerdings scheint auch eine definierte lipophile Einbettung der ICPs für deren Aktivität notwendig zu sein (GOVINDARAJAN & LINDOW 1988).

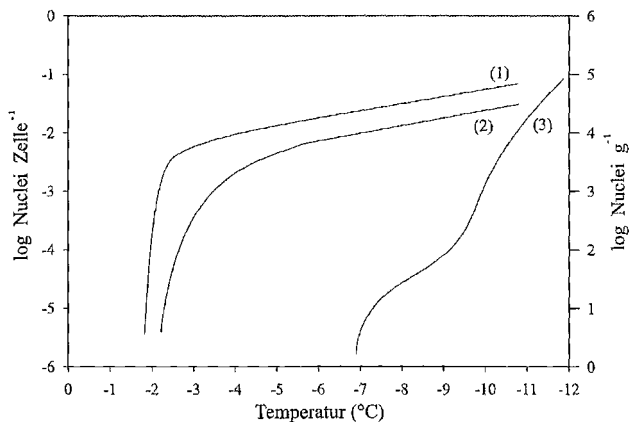


Abb. 7: Nukleationsaktivität von *Pseudomonas syringae* (1) und *Erwinia herbicola* (2) auf Blattoberflächen, und von bakterienfreien Blättern (3) von Mais (*Zea mays*) in Abhängigkeit von der Frosttemperatur (nach LINDOW 1982).

Besiedeln solche INA-Bakterien äußere und innere Pflanzenoberflächen in üblicher Dichte, so lösen sie frühzeitige Eisbildung aus (O'BRIEN & LINDOW 1988). Bei Erdbeeren, Mais und subtropischem Obst, die zwar milden Frost, aber keine Gefrierentwässerung aushalten, ist dies tödlich. Versuche, in solchen Nutzpflanzenkulturen die INA-Bakterien durch transgene Mutanten zu verdrängen, welche die Nukleationsaktivität verloren haben, scheiterten am Verbot der Freisetzung. Abgetötete INA-Bakterien werden jedoch bereits verwendet, z.B. zur Induktion der Wolkenbildung in Trockengebieten.

Das Ausmaß der Gefrierentwässerung ist enorm

Man kann flüssiges Wasser mit Hilfe der Kernresonanz-Spektroskopie von gefrorenem Wasser unterscheiden. Kennt man den Gesamtwassergehalt z.B. eines Blattes und bestimmt dann den Restgehalt flüssigen Wassers bei verschiedenen Frosttemperaturen, so bekommt man sogenannte **Gefrierkurven** (Abb. 8), aus denen man das Verhältnis von gefrorenem zu flüssigem (Rest-)Wasser für jede Frosttemperatur ablesen kann. Die Anteile gefrorenen Wassers sind bei gefrierresistenten Pflanzen schon bei mäßigem Frost enorm: So haben z.B. die Blattzellen des Efeu bei -8°C bereits 75 % ihres ursprünglichen Wassergehalts durch extrazelluläre Eisbildung verloren (HANSEN & BECK 1988, Abb. 8).

Je tiefer die Temperatur ist, desto mehr Wasser liegt als Eis vor. Durch mathematische Transformation der hyperbolischen Gefrierkurve erhält man eine Gerade, deren Schnittpunkt mit der Ordinate diejenige Menge an (Rest-)Wasser angibt, die wegen der Bindung an die Makromoleküle nicht gefrieren kann. Es handelt sich um einige wenige Prozent des Gesamtwassers. Dieses gebundene Wasser darf nicht mit "freiem" Wasser mit seinen bekannten physikochemischen Eigenschaften gleichgesetzt werden. Die "Kraft", mit der das gebundene Wasser an den Makromolekülen und Strukturen (z.B. der Zellwand) festgehalten wird, bezeichnet man als Matrixpotential oder matrikales Potential. Sie wird in bar oder Pascal (Megapascal) ausgedrückt und hat ein negatives Vorzeichen.

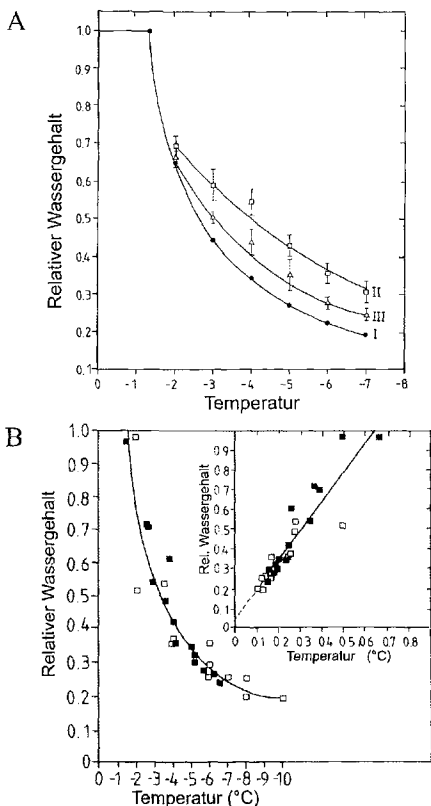


Abb. 8: Wasserhaushalt lebender (A: II; B: □) und erfrorener (A: III) Blätter von *Pachysandra terminalis*, einem in Japan beheimateten Buchsbaum-Gewächs (A) und Efeu (*Hedera helix*) (B). Aufgetragen ist der mit Hilfe von NMR-Spektroskopie (A: II, III; B: □) gemessene und der aus dem Wasserpotential von gefrorenen Gewebepreßsäften und Ψ_{Eis} mit Hilfe der Druck-Volumen-Relation berechnete (A: I; B: ■) relative Wassergehalt in Abhängigkeit von der Temperatur. Einsatz: Mathematische Transformation der hyperbolen Kurve in B in eine Gerade. Diese schneidet die Ordinate bei demjenigen Anteil an Gewebswasser, der nicht gefrieren kann.

Der Anteil des bei bestimmten Frosttemperaturen gefrorenen Gewebswassers hängt natürlich auch von der ursprünglichen Konzentration der zellulären Flüssigkeit ab. Es wurde schon ausgeführt, daß man in einem gefrorenen Blatt ein physikochemisches Gleichgewicht zwischen nicht gefrorener zellulärer Restflüssigkeit und dem extrazellulären Eis annehmen kann, das aus der Übereinstimmung der Wasserpotentiale Ψ (die immer einen numerischen Wert < 0 haben) resultiert:

$$\Psi_{\text{Eis}} = \Psi_{\text{Zelle}} = \Psi_{\text{Gewebe}} \approx \Psi_{\text{Blatt}}$$

Das Wasserpotential einer Zelle setzt sich zusammen aus dem osmotischen Potential (π), dem Matrixpotential (τ) und dem Druckpotential („Wanddruck“, P , welcher der Wasseraufnahme in die Zelle ein Ende setzt, sobald die Zellwand maximal gedehnt ist; deshalb hat P normalerweise ein positives Vorzeichen).

$$(-)\Psi_{\text{Gewebe}} = (-)\pi + (-)\tau + P$$

Bei mildem Frost und geringer Gefrierentwässerung ist τ noch 0, und P geht gegen 0. Beim „Turgor-Nullpunkt“ ($P = 0$) gilt dann:

$$(-)\Psi_{\text{Gewebe}} = (-)\pi = (-)\Psi_{\text{Eis}}$$

Sobald Gleichgewicht erreicht ist, kommt die Dehydratisierung zum Stillstand. In diesem Fall wird der Grad der Dehydratisierung außer durch die Temperatur nur durch die Konzentration der

zellulären Flüssigkeit¹⁾ bestimmt. Wenn diese Beziehung zutrifft, was meist bei schwachem Frost der Fall ist, spricht man von idealem Gleichgewichtsgefrieren.

Bleibt mehr Wasser im flüssigen Aggregatzustand als bei idealem Gleichgewichtsfrieren zu erwarten wäre, liegt „nicht-ideales Gleichgewichtsfrieren“ vor. Dies beobachtet man meist bei mäßigem Frost oberhalb -8°C , bei dem schon Entwässerungsraten bis zu 90% nicht selten sind. In einem solchen Fall müssen $(-)\tau$ und/oder P zum Wasserpotential des gefrorenen Pflanzenorgans beitragen. Bei starker Gefrierentwässerung wird die Zellwand stark nach innen gezogen und entwickelt so einen Sog anstelle des sonst ausgeübten Druckes: P wird negativ (Sog, negativer Turgor) und verstärkt $(-)\pi$. Ebenso entwickelt sich bei starker Entwässerung ein Matrixpotential; alle 3 Potentiale wirken nun gleichsinnig zusammen.

$$(-)\Psi_{\text{Gewebe}} = (-)\pi + (-)\tau + (-)P = (-)\Psi_{\text{Eis}}$$

Ein solcher Fall tritt bereits bei mäßigem Frost bei unserer Bodendeckerpflanze *Pachysandra terminalis* ein (Abb. 8A).

Hier gefriert deutlich weniger Wasser als nach den osmotischen Verhältnissen zu erwarten wäre.

¹⁾ Zwischen den Zellkompartimenten herrscht Wasserpotentialgleichgewicht; andernfalls würden intrazelluläre Wasserflüsse die Volumina der Kompartimente verändern.

Ein Teil des nicht gefrorenen überschüssigen Wassers geht auf das Konto von (-)P, ein anderer repräsentiert vermutlich das sich aufbauende Matrixpotential. Bei einer derart starken Entwässerung wie sie beim Gefrieren auftritt, bedeuten 12% mehr flüssiges Wasser (32% flüssiges Restwasser gegenüber 20% bei -7°C) eine nennenswert geringere Beanspruchung der Zellen. Nichtsdestoweniger sind 70 oder 80% Wasserverlust für eine Pflanzenzelle enorm. Schließlich hat die Zelle ja eine feste Zellwand, die sich bei Volumenverminderung nicht einfach zusammenziehen kann. Zellen, die nicht allseits fest in ein Gewebe eingebunden sind (z.B. Mesophyllzellen), kollabieren und falten sich sogar ein, was man als **Gefriercytorrhise** bezeichnet. Beim Auftauen ist dieser Prozeß mit der Wasseraufnahme aus dem schmelzenden Eis voll umkehrbar.

Wie aber verhält sich starres Gewebe bei noch tieferen Frosttemperaturen? Auf diese Frage gibt es noch keine klare Antwort. Bei großlumigen Hypodermiszellen von *Senecio keniodendron* wurde beobachtet, daß sich beim Gefrieren Gasblasen in der Vakuole bilden ("intrazelluläre Kavitation"), die zu einer Entspannung der durch den Wasserexport entstandenen Sogsituation führen. Beim Schmelzen des extrazellulären Eises und der Rehydratisierung der Zellen verschwinden diese Gasblasen wieder. Man nimmt an, daß es sich bei diesen Gasblasen um Wasserdampf handelt, der sich infolge des starken Sogs aus dem Zellsaft bildet.

Der Einfluß der Zellwand auf die Gefrierentwässerung ist umstritten

Sowohl bei der Cytorrhise, wie auch bei der Dampfblasenbildung stellt sich die Frage, warum sich der Protoplast nicht einfach wie bei der Plasmolyse von der Zellwand ablöst. Diese Frage ist auch heute noch nicht abschließend beantwortet und der Begriff der Gefrierplasmolyse ist noch nicht aus der Literatur verschwunden. Hier kommt nun das Matrixpotential ins Spiel: Im Gegensatz zur Plasmolyse befindet sich das Gewebe ja nicht in einem wässrigen Milieu, sondern die Interzellularen sind mit Luft gefüllt. Es gibt also keine wässrige Lösung, die von außen her durch die Zellwand eindringen und den Raum zwischen dem immer kleiner werdenden Protoplasten und der Zellwand ausfüllen könnte. Das einzig mögliche Medium ist Luft. Diese kann aber die Zellwand nicht durchdringen, da sie die Flüssigkeit, d.h. das gebundene Hydratationswasser daraus verdrängen müßte; in anderen Worten, das Matrixpotential überwinden müßte. Wie groß dieses im Einzelfall ist, kann nicht ohne weiteres ermittelt werden. Schätzungen, die von der bekannten Porengröße (in der Primärwand) ausgehen, liegen zwischen -200 und -900 bar (ZHU & BECK 1991). Dies sind (negative) Drücke, denen eine normale Pflanzenzelle keinesfalls gewachsen sein dürfte. Bleibt die Zelle am Leben, darf keine Luft zwischen Zellwand und Plasmamembran eindringen und die Zellwand muß dem sich kontrahierenden Protoplasten folgen, bis es zur Kavitation in der Vakuole kommt. Unab-

hängig davon, daß die Zelle diesen physikalischen Gesetzen unterworfen ist, kann man sich fragen, ob die Zellwand nun Schutz oder Belastung für die gefrierende Zelle ist. Hier gehen die Meinungen stark auseinander. Wir können in den beschriebenen Phänomenen keine unmittelbar schädigende Belastung der Zelle erkennen. Andererseits wurde aber von einer deutlich größeren Frosthärte von zellwandlosen Protoplasten im Vergleich zum Gewebe berichtet. Allerdings mußten diese Experimente zwangsläufig in flüssigem Medium durchgeführt werden.

Gefrierschutzmittel: Es gibt viele Arten von kryoprotektiven Stoffen

• Niedermolekulare Kryoprotektiva

Die bekanntesten "Kälteschutzmittel" (Kryoprotektiva) sind niedermolekulare, sehr hydrophile Solute, wie z.B. Saccharose und ihre Galactoside, Polyole und verschiedene Stickstoffverbindungen (Aminosäuren, Polyamine, Betaine; RUDOLPH & CROWE 1985). Ihre zellulären Konzentrationen steigern sich im Zuge der Frosthärtung und verringern sich bei der Enthärtung. Bei den immergrünen Nadelbäumen stellt sich im Zuge der Frosthärtung der gesamte photosynthetische Kohlenhydratmetabolismus um, von einem Stärke-betonten Stoffwechsel im Sommer, zu einem fast reinen Oligosaccharidstoffwechsel im Winter (HANSEN & BECK 1994). Stärkeverzuckerung selbst ist ein wohlbekanntes Phänomen, z.B. bei zu kaltem Lagern von Winterkartoffeln.

Über die zweifache Funktion dieser Solute, den Gefrierschutz und den Membranschutz ist soviel geschrieben worden (z.B. HANSEN 2000), daß hier nicht im Detail darauf eingegangen werden muß.

Jedoch möchten wir auf zwei Aspekte hinweisen, die oft übersehen werden:

1. Die Spezifität der Kryoprotektiva: Die Akkumulation von Saccharose und ihren Galactosiden Raffinose, Stachyose und Verbascose schützt z.B. nicht alle Biomembranen in einer Koniferen-Mesophyllzelle. Zum Schutz der photosynthetischen Membranen im Chloroplasten sind sie ungeeignet (WEIß 1974); sie kommen *in vivo* auch gar nicht in den Chloroplasten vor. Man muß, um eine derartige Schutzwirkung aufzuspüren, wohl immer die natürliche Kompartimentierung der jeweiligen Kryoprotektiva berücksichtigen.
2. Der sog. kolligative (physikochemische) Effekt dieser Solute trägt zunächst kaum zum Gefrierschutz bei: Eine 1-osmolare Lösung, z.B. von Saccharose bringt eine Gefrierpunktsdepression von gerade einmal $-1,9^{\circ}\text{C}$. Diese ist physiologisch unbedeutend. Erst wenn im Zuge der Gefrierentwässerung 80% des Gewebswassers oder noch mehr den Zellen entzogen sind, wird der Effekt erkennbar: Jetzt ist die Restlösung nicht mehr 1-osmolar, sondern 5-osmolar und die Gefrierpunktserniedrigung mit fast -10°C schlägt physiologisch zu Buche. Gewebe, die stark unterkühlen, können dies also nicht mit Hilfe der

kolligativen Eigenschaften der Kryoprotektiva bewerkstelligen. Aber Gewebe mit extrazellulärer Eisbildung könnten ohne diese Kryoprotektiva nicht überleben.

• **"Cold-related proteins"**

Die Entdeckung der Hitzeschockproteine hat die kontinuierlich schwelende Diskussion um Kälteschock- oder kälteinduzierte "Frostproteine" wieder aufleben lassen und die Molekularbiologie hat auch auf diesem Gebiet einen enormen Fortschritt gebracht. Allerdings sind noch eine Reihe von Kernfragen ungelöst, z.B. wie die Pflanze die Kälte spürt. Aber für die meisten dieser Fragen gibt es zumindest realistische Hypothesen (s.u.). Proteine, deren Induktion (oder Repression) durch Kälte ausgelöst oder gefördert wird, kann man zumindest mit drei unterschiedlichen physiologischen Wirkungen in Verbindung bringen: Indirekt wirken Enzyme, die zu einer Umsteuerung des Stoffwechsels und einer Veränderung der molekularen Bausteine im Zuge der Frosthärtung oder -enthärtung führen; Enzyme also, die z.B. Kryoprotektiva synthetisieren oder die Desaturierung von Membranlipiden bewerkstelligen. Entsprechende Gene wurden, vor allem in *Arabidopsis* aufgespürt und ihre Wirkung nachgewiesen: Unter den sogenannten *SFR*-Genen ist *SFR-4*, dessen Mutation zu einer Verringerung der Akkumulation von Kryoprotektiva und einer Erniedrigung des Gehalts an ungesättigten Fettsäuren führt (WARREN *et al.* 1996, MCKOWN *et al.* 1996).

Eine ähnlich übergreifende Funktion scheint das *Eskimo1*-Gen, ebenfalls von *Arabidopsis* zu haben, dessen Mutation zu einer Erhöhung der Frosttoleranz führte, indem die intrazelluläre Konzentration von Prolin 30-fach und die von Kohlenhydraten zweifach anstieg (XIN & BROWSE 1998). Außerdem wurden auch Membranschutzproteine stärker exprimiert.

Die 2. Gruppe von Proteinen, deren Bildung durch Kälte induziert wird, sind eben solche Membranschutzproteine, die die verschiedensten Bezeichnungen tragen und nicht nur im Zusammenhang mit Kälte aufgefunden worden waren. Diese haben keine enzymatische Funktion, sondern schützen die Biomembranen bei Dehydratisierung der Zellen, vermutlich auch bei Viskositätsverlust vor der Auflösung in Lipidtröpfchen und -röhren (Hexagonal II-Phase). Es handelt sich bei diesen Proteinen um relativ kleine, extrem hydrophile Moleküle (15 - 40 kDa), die weder durch Kochen noch durch Säurebehandlung präzipitiert werden können. Vielfach zeigen sie charakteristische repetitive Motive von 10 - 20 Aminosäureresten, wie z.B. das lysinreiche K-Segment oder das glycinreiche F-Segment der sogenannten **LEA-Proteine** (LEA = **L**ate **E**mbryogenesis **A**bundant), die in den Embryonen reifender (= austrocknender) Samen akkumulieren und dort durch ihren amphiphilen Charakter schützend mit den Membranen wechselwirken (DURE 1993). Mittlerweile kennt man 6 Gruppen derartiger LEA-Proteine. Mit Hilfe der molekularbiologischen

Techniken sind darüber hinaus zahlreiche weitere Gene bekannt, die als "cold-regulated genes" oder "cold-responsive genes" Membranschutz-Proteine codieren, deren Wirkungsweise aber noch nicht bekannt ist (THOMASHAW 1999).

Die dritte Gruppe Kälte-induzierter Proteine bilden die sog. **Antifreeze Proteins** oder "Thermal Hysteresis Proteins" (THPs), die vom Protoplasten in den Apoplasten ausgeschieden werden und dort die Eisbildung behindern und damit auch kontrollieren. Derartige Antifreeze Proteins kennt man schon lange von Fischen und Insekten, wo sie offenbar das Gefrieren von Körperflüssigkeiten verhindern. Dort scheinen sie den Gefrierpunkt auf nicht-kolligative Weise zu erniedrigen. Die aus dem Apoplasten z.B. von Roggenpflanzen extrahierten Antifreeze Proteins sind allerdings nicht ganz so wirksam wie die tierischen Vertreter. Die Wirkung dieser Proteine wird an ihrem Test evident: Man beobachtet unter dem Mikroskop das Wachsen eines Eiskristalls in einer sehr verdünnten AFP-Lösung und die Bildung neuer Eiskristalle beim Abkühlen. Dabei stellt man eine meist deutlich tiefere Nukleationstemperatur und beim Abkühlen ein viel langsames Wachstum der vorhandenen Eiskristalle als in Wasser ohne AFP fest. Hingegen wird der Schmelzpunkt der Eiskristalle nicht beeinflusst. Daraus ergibt sich eine Hysterese beim Einfrieren und Auftauen, weshalb diese Proteine auch als THPs bezeichnet werden.

Über die Wirkungsweise dieser Proteine gibt es bereits eine plausible Vorstellung, die davon ausgeht, daß AFPs amphipatisch sind, d.h. eine hydrophile und eine hydrophobe Längsseite haben, ähnlich wie die Dehydrine. Während sich nun die Dehydrine mit der hydrophoben Längsseite an die Membranen legen und ihre hydrophile Seite nach außen kehren, legen sich die AFPs mit der hydrophilen Längsseite an die Eiskristalle und orientieren die hydrophobe Seite nach außen, wodurch die Anlagerung weiterer Wassermoleküle erschwert wird (DE VRIES 1984).

Signale und Signaltransduktion der Frosthärtung

In Gebieten mit Jahreszeitenklima durchlaufen ausdauernde Pflanzen unterschiedliche Phasen der Frosttoleranz (BECK *et al.* 1994):

- Extreme Frosthärte im Winter
- Enthärtung im Frühjahr
- Frostempfindlichkeit im Sommer
- Frosthärtung im Herbst

Die Frosthärtung im Herbst bietet ausdauernden Pflanzen einen Schutz vor Kälte und Frostrocknis während des Winters. Sie muß vor dem Eintreten der lebensbedrohenden Situationen einsetzen und erfordert somit vorausseilende Umweltsignale, die rezipiert und umgesetzt werden müssen, damit die biochemischen und physiologischen Veränderungen

abgeschlossen sind, wenn die Kälte lebensbedrohend wird. Zwei exogene Faktoren sind als Härtungs-induzierende Signale identifiziert worden: Eine verkürzte tägliche Lichtperiode und Temperaturen um den Gefrierpunkt und darunter. Während bei Holzgewächsen die Frosthärtung von beiden Faktoren unabhängig voneinander induziert werden kann, sind bei krautigen Pflanzen ausschließlich niedrige Temperaturen als Induktionssignal wirksam.

Kurze Tageslängen induzieren dabei offensichtlich andere Stoffwechselprozesse als niedrige Temperaturen. Während bei der Waldkiefer die Frosthärte nach Induktion durch kurze Tageslängen unter 12 h mit einer Rate von $0,3^{\circ}\text{C}/\text{Tag}$ ansteigt, bewirken milde Fröste eine signifikant höhere Rate der Abhärtung mit $0,8^{\circ}\text{C Tag}^{-1}$ (HANSEN & HEIM, unveröffentlicht).

Entsprechende Unterschiede in der Induktion von Stoffwechselprozessen haben sich auch bei der Fichte gezeigt: Während die Desaturation der Membranlipide von Temperaturen unter dem Gefrierpunkt ausgelöst wird, induzieren Tageslängen unter 12h die relative Vermehrung der Membranlipide (SENER & BECK 1982). Erwartungsgemäß wird die Tages- bzw. Nachtlänge über das Phytochrom und wahrscheinlich auch über einen Blaulichtphotorzeptor gemessen. Hingegen kann die Rezeption des Kältestimulus und dessen Umsetzung in ein molekulares Signal bisher noch nicht schlüssig erklärt werden. Derzeitige Vorstellungen gehen davon aus, daß die Transduktion des Kältesignals durch eine

temperaturabhängige Veränderung der Membranstruktur und eine daraus resultierende Konformationsänderung membranintegraler Proteine in Gang gesetzt wird. Als eine wahrscheinliche Komponente dieses Transduktionsweges hat sich das Phytohormon Abszisionsäure (ABA) herausgestellt (HEINO *et al.* 1990, MÄNTYLÄ *et al.* 1995, LALK & DÖRFFLING 1985, LANG *et al.* 1994). Allerdings diskutiert man heute mindestens vier Signaltransduktionswege, ABA-abhängige und ABA-unabhängige, die zur Expression kältebezogener Gene führen (YAMAGUCHI-SHINOZAKI & SHINOZAKI 1997). Diese Signaltransduktionswege verlaufen aber nicht nur parallel, sondern interagieren vermutlich, wobei Ca^{2+} -Ionen eine wichtige Rolle spielen könnten (GEHRING *et al.* 1990, KNIGHT *et al.* 1991, MONROY *et al.* 1993). Zieht man in Betracht, daß die durch Kälte und durch kurze Tageslängen ausgelöste Frosthärtung auf wahrscheinlich verschiedenen Wegen geschieht, so kann man nicht ausschließen, daß noch weitere Signaltransduktionswege existieren.

Gefriertoleranz kostet Effizienz, die Unterkühlungsstrategie ist riskant

Die "Strategie" unserer Nadelbäume zur Frostbewältigung ist das extrazelluläre Gefrieren. Sobald die Eisbildung erfolgt ist, kommt die Photosynthese zum Erliegen. Im Zuge der Frosthärtung werden in den Chloroplasten der Waldkiefer etwa 30 % der chlorophyllbindenden Antennenproteine abgebaut (Kiefern sehen im Winter eher gelbgrün aus), was

man als Schutz der photosynthetischen Membranen vor Lichtstreß bei scharfem Frost interpretieren kann. Im nicht gefrorenen Zustand bedeutet dies aber eine erhebliche Einschränkung der Photosyntheseleistung (VOGG *et al.* 1998a, b). Entsprechende Experimente zur CO₂-Assimilation mit Fichtennadeln zeigen denn auch eine Reduktion der potentiellen Photosyntheseleistung um ca. 80% (SENER & BECK 1979)! Allerdings muß sich diese Einschränkung der Photosynthese nicht zwangsläufig negativ auswirken, da unter dem Einfluß tiefer Temperaturen die Dissimilation ebenfalls erheblich eingeschränkt ist (HANSEN & BECK 1994).

Tropische Hochgebirgspflanzen besiedeln Höhenlagen mit täglichem Frostwechsel. Da die Frostereignisse 12 Stunden täglich selten über-, und -10 bis -15°C kaum unterschreiten, findet man bei den sogenannten Riesenrosettenpflanzen dieser Regionen neben der Strategie des extrazellulären Gefrierens auch die der Unterkühlung. Erstere bei den Senecionen Ostafrikas, letztere bei den baumgleichen Espeletien der Anden. Offensichtlich reicht die Unterkühlungskapazität der Espeletien für die Bewältigung der in ihrem Habitat auftretenden Fröste aus; löst man jedoch Eisbildung aus, so werden sie letal geschädigt (GOLDSTEIN *et al.* 1985, RADA *et al.* 1987). Die Blätter der ostafrikanischen Senecionen oder Lobelien können steif gefrieren, ohne daß Frostschäden gesetzt werden und auch das enorm schnelle Auftauen durch die tropische Sonne schadet offensichtlich nicht (BECK *et al.* 1984). Trotz-

dem zeigen die Riesenrosettenblätter Gefriervermeidungsstrategien, z.B. durch Bildung einer "Nachtknospe" oder durch den Besitz und das tägliche Aufladen eines Wärmespeichers. Warum vermeidet ein gefriertolerantes Gewebe das Gefrieren? Vermutlich überfordert der tägliche (bzw. nächtliche) Export eines Großteils der Zellflüssigkeit (s. o.) und der minutenschnelle Import desselben beim Auftauen auf die Dauer die biochemische Ausstattung der Zellen; das relativ schnelle Altern der äußeren Rosettenblätter, welche die Nachtknospe schützen und deshalb den Gefriervorgang nicht vermeiden können, spricht für diese Hypothese. Vergleicht man die beiden Strategien der Frostbewältigung, so wird klar, daß Gefriertoleranz als sicherer Schutz vor Frostschäden aufwendig ist, Unterkühlung als "kostengünstige" Lösung dafür einen hohen Risikofaktor birgt.

Schlußbemerkung

Der Leser und die Leserin, die bis hierher durchgehalten haben, vermissen wahrscheinlich hier und da erwartete Details. Die Autoren sind sich der Lückenhaftigkeit ihres Beitrags wohl bewußt. Er stützt sich, die molekularbiologischen Befunde ausgenommen, weitgehend auf eigene Arbeiten, die im Wesentlichen Gegenstand des am 27. Mai 1998 in Wien gehaltenen Vortrags waren. Eine ausführliche Übersicht über die neuesten molekularbiologischen Erkenntnisse (die allerdings physiologischer Interpretation noch weitgehend entbehren) findet sich bei THOMASHOW (1999).

Literatur:

- BECK E., HANSEN J., HEIM R., SCHÄFER C., VOGG G., LEBORGNE C., TEULIERES C. & BOUDET A.M. 1994: Cold hardening and dehardening of evergreen trees. In: SANDERMANN H. & BONNET-MASIMBERT M. (eds.): EUROSILVA – Contributions to Forest Tree Physiology, INRA Ed. (no. 76), Paris, pp 171-193
- BECK E., SCHULZE E.D., SENSER M. & SCHEIBE R. 1984: Equilibrium freezing of leaf water and extracellular ice formation in Afroalpine 'giant rosette' plants. *Planta* 162: 276-282
- BODNER M. & LARCHER W. 1987: Chilling susceptibility of different organs and tissues in *Saintpaulia ionantha* and *Coffea arabica*. *Angew Bot* 61: 3-4
- BURKE M.J., GEORGE M.F. & BRYANT R.G. 1975: Water in plant tissues and frost hardiness. In: DUCKWORTH R.B. (ed): Water realtions of foods, Academic Press, London
- DEVRIES A.L. 1984: Role of glyco peptides and peptides in inhibition of crystallization of water in polar fishes. *Trans R Soc London B304*: 575-588
- DURE L. 1993: A repeating 11-mer amino acid motif and plant desiccation. *Plant J* 3: 363-369
- GARBER M.P. & STEPONKUS P.L. 1976: Alterations in chloroplast thylakoids during an in vitro freeze-thaw cycle. *Plant Physiol.* 57: 673-680
- GEHRING C.A., IRVING H.R. & PARISH R.W. 1990: Effects of auxin and abscisic acid on cytosolic calcium and pH in plant cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 9645-9649
- GOLDSTEIN G., RADA F. & AZOCAR A. 1985: Cold hardiness and supercooling along an altitudinal gradient in andean giant rosette species. *Oecologia* 68: 147-152
- GOVINDARAJAN A.G. & LINDOW S.E. 1988: Phospholipid requirement for expression of ice nuclei in *Pseudomonas syringae* and in-vitro. *J Biol Chem* 263: 9333-9338

- GROSS D.C., PROEBSTING E.L. & MACCRINDLE-ZIMMERMAN H. 1988: Development, distribution, and characteristics of intrinsic, nonbacterial ice nuclei in *Prunus* wood. *Plant Physiol* 88: 915-922
- GREEN R.L., WARREN G.J. 1985: Physical and functional repetition in a bacterial ice nucleation gene. *Nature* 317: 645-648
- HANSEN J. 2000: Überleben in der Kälte - Wie Pflanzen sich vor Froststreß schützen. *Biologie in unserer Zeit* 30: 26-36
- HANSEN J. & BECK E. 1988: Evidence for ideal and non-ideal equilibrium freezing of leaf water in frosth Hardy ivy (*Hedera helix*) and winter barley (*Hordeum vulgare*). *Bot. Acta* 101: 76-82
- HANSEN J. & BECK E. 1994: Seasonal changes in the utilization and turnover of assimilation products in 8-year-old Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) trees. *Trees* 8: 172-182
- HEINO P., SANDMAN G., LANG V., NORDIN K. & PALVA E.T. 1990: Abscisic acid deficiency prevents development of freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Theor. Appl. Genetics* 79: 801-806
- HOLZER J. 1996 Charakterisierung von Modellmembranen und Tonoplastenvesikeln aus Zellkulturen von *Larix decidua* Mill. mittels Fluoreszenzpolarisation, Staatsexamensarbeit Universität Bayreuth
- ISHIKAWA S. 1984 Deep supercooling in most tissues of wintering *Sasa senanensis* and its mechanism in leaf blade tissues. *Plant Physiol* 75: 196-202
- KAKU S. 1973: High ice nucleating ability in plant leaves. *Plant Cell Physiol* 14: 1035-1038
- KNIGHT M.R., CAMPBELL A.K., SMITH S.M. & TREWAVAS A.J. 1991: Transgenic plant aequorin reports the effects of touch, cold-shock and elicitors on cytoplasmic calcium. *Nature* 352: 524-526
- LALK I. & DÖRFFLING K. 1985: Hardening, abscisic acid, proline and freezing resistance in two winter wheat varieties. *Physiol. Plant.* 63: 287-292

- LANG V., MÄNTYLÄ E., WELIN B., SUNDBERG B., PALVA E.T. 1994: Alterations in water status, endogenous abscisic acid content and expression of rab18 gene during the development of freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 104: 1341-1349
- LARCHER W. 1994: Ökophysiologie der Pflanzen. Eugen Ulmer, Stuttgart
- LARCHER W. 1985: Kälte und Frost. In: SORAUER P. (ed): Handbuch der Pflanzenkrankheiten, Vol. I, Parey, Berlin, pp 107-326
- LARCHER W. & NAGELE M. 1985: Induktioskinetik der Chlorophyllfluoreszenz unterkühlter und gefrorener Blätter von *Rhododendron ferrugineum* beim Übergang vom gefrierempfindlichen zum gefriertoleranten Zustand. *Sitzungsber Österr Akad Wiss Math-Naturwiss K1 Abt I* 194: 187-195
- LEVITT J. 1980: Responses of plants to environmental stresses. Vol I, Chilling, freezing, and high temperature stress. Academic Press, New York, London, Toronto.
- LICHTENTHALER H.K. & MIEHÉ J.A. 1997: Fluorescence imaging as a diagnostic tool for plant stress. *Trends in Plant Sciences* 2: 316 - 320
- LINDOW S.E. 1982: Population dynamics of epiphytic ice nucleation active bacteria on frost sensitive plants and frost control by means of antagonistic bacteria. In: LI P.H. & SAKAI A. (eds): *Plant cold hardiness and freezing stress*, Vol. 2, Academic Press, New York, London, Paris, 395-416
- LUYET B.J. & THOENNES G. 1938: The survival of plant cells immersed in liquid air. *Science* 23: 284-285
- MÄNTYLÄ E., LANG V. & PALVA E.T. 1995: Role of abscisic acid in drought-induced freezing tolerance, cold acclimation and accumulation of LT1 78 and RAB 18 proteins in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 107: 141-14
- MAZUR P. 1977: The rate of intracellular freezing in the death of cells cooled at supraoptimal rates. *Cryobiology* 14: 251-272

- MCKOWN R., KUROKI G. & WARREN G. (1996) Cold response of *Arabidopsis* mutants impaired in freezing tolerance. *J. Exp. Bot.* 47: 1919-1925
- MONROY A.F., SARHAN F. & DHINDSA R.S. 1993: Cold-induced changes in freezing tolerance, protein phosphorylation and gene expression. *Plant Physiol.* 102: 1227-1235
- MÜLLER-THURGAU H. 1886: Ueber das Gefrieren und Erfrieren der Pflanzen. *Landwirtschaftliche Jahrbuecher* (Berlin) XV: 453-610
- O'BRIEN R.D. & LINDOW S.E. 1988: Effect of plant species and environmental conditions on ice nucleation activity of *Pseudomonas syringae* on leaves. *Appl Environ Microbiol* 54: 2281-2286
- OTTANDER C., CAMPBELL D. & ÖQUIST G. 1995: Seasonal changes in photosystem II organisation and pigment composition in *Pinus sylvestris*. *Planta* 197: 176-183
- RADA F., GOLDSTEIN G., AZOCARA. & TORRES F. 1987: Supercooling along an altitudinal gradient in *Espeletia schultzii*, a caulescent giant rosette species. *J Exp Bot* 38: 491-497
- RUDOLPH A.S. & CROWE H.J. 1985: Membrane stabilization during freezing: the role of two natural cryoprotectants, trehalose and proline. *Cryobiology* 22: 367-377
- SAKAI A. & LARCHER W. 1987: Frost survival of plants. *Ecol Studies* 62, Springer, Berlin, Heidelberg
- SAKAI A., OTSUKA K. & YOSHIDA S. 1968: Mechanism of survival in plant cells at super-low temperatures by rapid cooling and rewarming. *Cryobiology* 4: 165-173
- SCHEIBE R. & BECK E. 1990: Ecophysiological studies on afroalpine plants. *Geographica Bernensia* A8: 159-166
- SENSER M. & BECK E. 1982: Frost resistance in spruce (*Picea abies* (L.) Karst.): V. Influence of photoperiod and temperature on the membrane lipids of the needles. *Z. Pflanzenphysiol.* 108: 71-85

- SENSER M. & BECK E. 1979: Kälteresistenz der Fichte. II. Einfluß von Photoperiode und Temperatur auf die Struktur und photochemischen Reaktionen von Chloroplasten. Ber Deutsch Bot Ges 92: 243-259
- SUGAWARA Y. & SAKAI A. 1978: Cold acclimation of callus cultures of Jerusalem artichoke. In: LI P.H. & SAKAI A. (eds.): Plant Cold Hardiness and Freezing Stress. Vol. 1, Academic Press, New York, pp. 197-210
- THOMASHOW M.F. 1999: Plant cold acclimation: Freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 50: 571-599
- UEMURA M. & STEPONKUS P.L. 1994: A contrast of the plasma membrane lipid composition of oat and rye leaves in relation to freezing tolerance. Plant Physiol 104, 479-496
- VOGG G., HEIM R., HANSEN J., SCHÄFER C. & BECK E. 1998a: Frost hardening and photosynthetic performance of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) needles. I. Seasonal changes in the photosynthetic apparatus and its function. Planta 204: 193-200
- VOGG G., HEIM R., GOTSCHY B., BECK E. & HANSEN J. 1998b: Frost hardening and photosynthetic performance of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.). II. Seasonal changes in the fluidity of thylakoid membranes. Planta 204: 201-206
- WARREN G., MCKOWN R., MARIN A. & TEUTONICO R. 1996: Isolation of mutations affecting the development of freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Plant Physiol. 111: 1011-1019
- WEIß G. 1974: Der Einfluß verschiedener Zuckerkonzentrationen auf die Kälteresistenz isolierter Chloroplasten von *Picea abies*. Staatsexamensarbeit Universität München
- WILLIAMS W.P. 1990: Cold-induced lipid phase transitions. Phil. Trans. R. Soc. Lond. B 326: 555-570
- XIN Z. & BROWSE J. 1998: *Eskimo1* mutants of *Arabidopsis* are constitutively freezing-tolerant. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 7799-7804

- YAMAGUCHI-SHINOZAKI K. & SHINOZAKI K. 1997: Gene expression and signal transduction in water-stress response. *Plant Physiol.* 115: 327-334
- YOSHIDA S. 1994: Low temperature-induced cytoplasmic acidosis in cultured Mung bean (*Vigna radiata* [L.] Wilczek) cells. *Plant Physiol* 104: 1131-1138
- YOSHIDA S. & SAKAI A. 1973: Phospholipid changes associated with the cold hardiness of cortical cells from poplar stem. *Plant Cell Physiol* 14: 353-359
- ZHU J.J. & BECK E. 1991: Water relations of *Pachysandra* leaves during freezing and thawing. *Plant Physiol.* 97: 1146-1153

Anschrift der Verfasser:

Dr. Jens Hansen

Prof. Dr. Erwin Beck

Lehrstuhl für Pflanzenphysiologie

Universität Bayreuth

Universitätsstr. 30

D 95440 Bayreuth

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Schriften des Vereins zur Verbreitung naturwissenschaftlicher Kenntnisse Wien](#)

Jahr/Year: 2002

Band/Volume: [137_140](#)

Autor(en)/Author(s): Hansen Jens

Artikel/Article: [Kälte und Pflanze: Updating classical views. 337-383](#)