



Hans H. Ruthenberg-Graduierten-Förderpreis 2021/

Hans H. Ruthenberg Award for Graduates 2021

Kai Steifen Bartusch “Elevated temperatures accelerate graft formation: a key factor for optimizing cotyledon micrografting”, Martin-Luther-University Halle-Wittenberg, 2020

Supervisor: Prof. Dr. Marcel Quint

Problemstellung

Im Jahr 2050 werden laut Prognosen der Vereinten Nationen neun bis zehn Milliarden Menschen auf unserem Planeten leben. Die Sicherung der Nahrungsversorgung einer solch stark wachsenden Bevölkerung stellt uns zunehmend vor Herausforderungen, die wir nur durch komplexe Lösungen mit vielfältigen Innovationen meistern werden. Unsere Nahrungsproduktion ist direkt vom Pflanzenbau abhängig. Allerdings stehen nur begrenzt landwirtschaftliche Nutzflächen zur Verfügung. Daher muss das Ziel sein, qualitativ hochwertige Pflanzensorten in ein nachhaltiges Anbausystem zu etablieren. Hierbei müssen von der Aussaat bis zur Ernte biotische und abiotische Stressfaktoren erfolgreich abgewendet werden, um hohe Erträge zu erzielen.

Seit Jahrtausenden machen sich die Menschen das sogenannte Pfropfen (engl. grafting) zu Nutze, wobei Teile zweier Pflanzensorten vereinigt werden und als eine ertragreichere Pflanze weiterwachsen. In der Regel werden hierbei eine widerstandsfähige Unterlage als Wurzelstock mit einer hochqualitativen Edelsorte als Spross kombiniert. Diese Methode ist bereits in einem weiten Spektrum unserer Nutzpflanzen etabliert. Beispielsweise werden im Obst- und Weinbau mittlerweile fast alle Kulturpflanzen gepfropft. Ferner werden im Gemüsebau Tomaten, Auberginen und andere Kulturarten veredelt. Zunehmend werden Pfropfungsmethoden auch in der Produktion von Grundnahrungsmitteln interessant. So kann schon heute durch das sogenannte Mukibat-Pfropfen bei Maniok eine Verdopplung des Ertrages erzielt werden und die Potentiale des Pfropfens sind hier bei weitem noch nicht ausgeschöpft. Dies und vermutlich auch viele weitere innovative Konzepte werden dem Pfropfen mehr Bedeutung in vielen Arealen der Welt zukommen lassen.

Die beim Pfropfen ablaufenden physiologischen Prozesse sind bisher noch wenig verstanden. So muss nach der Vereinigung der Pflanzenteile die Pflanze selbstständig die entstandenen Wunden effizient heilen. Zellneubildung und die daran anschließende Neuverknüpfung der pflanzlichen Leitgefäße sind zentral für den Pfropfungserfolg, sodass die Stoffflüsse und die Kommunikation zwischen den pflanzlichen Organen gewährleistet sind. Wenn man diese zu Grunde liegenden Prozesse besser verstehen kann, ergibt sich so ein enormer Spielraum, um diese Pfropfungsmethoden weiter zu optimieren und so schlussendlich höhere Erträge einzufahren.

Zielsetzung

Das Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss der Temperatur auf den Pfropfungsvorgang zu untersuchen und möglicherweise so Handlungsempfehlungen für die Praxis abzuleiten. Insbesondere sollte hier die temperaturabhängige Wiederverknüpfung der pflanzlichen Gefäße beleuchtet werden. Dabei sollte zudem geklärt werden, von welchen molekularen Regulatoren ein vermeintlicher Temperatureffekt im Pfropfen hervorgerufen wird. Dieses tiefgreifende Verständnis über den Einfluss der Temperatur sollte dann in der Praxis am Beispiel der Transplantation von Kotyledonen getestet und zur Optimierung dieser Pfropfungstechnik genutzt werden.

Methodisches Vorgehen

Um den Temperatureinfluss auf das Pfropfen im Detail zu analysieren, wurde mit der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* gearbeitet. Als Modellsystem wurde das sogenannte Hypokotyl-Mikropfropfen gewählt, welches das Pfropfen von einem Spross auf einen Wurzelstock in der gartenbaulichen Praxis nachempfunden. Es sollten nun Pfropfungen vorgenommen werden und unterschiedliche Temperaturen nach dem Pfropfen während des Verheilungsprozesses angewendet werden. Anschließend sollten die molekularen Einflussfaktoren identifiziert werden durch das Testen von verschiedenen Mutationslinien und ergänzende pharmakologische Experimente. Mit modernsten physiologischen und fluoreszenzmikroskopischen Techniken wurde hierbei die Gefäßneubildung studiert. Nachfolgend sollte nun die Erkenntnis über den Temperatureinfluss auf die Kotyledonen-Transplantation übertragen werden und die bisher unbefriedigenden Pfropfungserfolgsraten verbessert werden, wobei die Pfropfungsmethode grundlegend überarbeitet werden musste.

Ergebnisse

Durch das Testen von 20 °C als gewöhnliche Wachstumstemperatur von *A. thaliana* und 27 °C als erhöhtes Temperaturniveau konnte festgestellt werden, dass höhere Temperaturen den Pfropfungsvorgang beschleunigen, was sogar die Erfolgsrate erheblich steigern kann. Somit konnten die in vorhergehenden Studien erwähnten Beobachtungen über die vermeintliche Bedeutung der Temperatur beim Pfropfen bestätigt werden. Durch detaillierte Analysen mittels fluoreszierender Farbstoffe konnte die Wiederverknüpfung der pflanzlichen Gefäßsysteme als entscheidender Schritt für den Pfropferfolg nachvollzogen werden. Hierbei wurde ermittelt, dass sowohl das Kohlenhydrate und Hormone transportierende Phloem wie auch das Wasser und Mineralsalze transportierende Xylem sich etwa 25 % schneller wiederverbinden bei einem erhöhten Temperaturniveau. Durch das Screening von verschiedenen Mutationslinien konnte die physiologische Signalkaskade innerhalb der Pflanze rekonstruiert werden, die verantwortlich für diesen Temperatureffekt ist: Das Pflanzenhormon Auxin war bereits zuvor als entscheidender Regulator bei der Neubildung von Gefäßen und so auch beim Pfropfen identifiziert worden. Wenn nun eine Temperaturerhöhung direkt nach dem Pfropfen stattfindet, wird im Spross der Pflanze mehr Auxin gebildet, was sich an der Pfropfstelle akkumuliert. Je höher die Temperatur, desto höher das Auxin-Level und desto schneller werden die neuen Gefäße gebildet. Natürlich lässt sich dies nicht unbegrenzt mit immer noch höheren Temperaturen fortsetzen, da sonst Hitzestress als hemmender Faktor einsetzen würde. Jedoch kann man so durch weiterführende Versuche für jede Pflanzenart spezifisch den optimalen, oberen Temperaturbereich bestimmen, eine schnelle Verheilung fördern und hohe Erfolgsquoten in der Zukunft erzielen.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde diese Erkenntnis nun auf das Transplantieren von Kotyledonen exemplarisch übertragen. Durch das Überarbeiten der Pfropfungstechnik und die Optimierung von weiteren Einflussfaktoren wie Licht und Temperatur konnte die Erfolgsrate

von den bisher unbefriedigenden 2 % auf über 90 % angehoben werden. Dieses Protokoll wurde dann ausführlich Untersuchungen der Gefäßneubildung unterzogen. Hier konnte eine erhebliche Verbesserung der Erfolgsquote durch Temperaturerhöhung aufgrund der damit einhergehenden schnelleren Gefäßneubildung erreicht werden. Mit diesem sehr robusten Protokoll kann nun zukünftig die zentrale Rolle der Kotyledonen während der Keimlingsentwicklung untersucht werden.

Die Arbeit hat rückblickend zu einem besseren Verständnis des Pfropfens und der dabei ablaufenden Prozesse beigetragen. Sie gibt parallel Impulse für die Optimierung von bestehenden aber auch neuartigen Pfropfmethoden bei verschiedenen Kulturpflanzenarten, womit schlussendlich höhere Erträge erzielt werden können.