



Technische Universität München

Abschlussbericht für das Forschungsprojekt:

**Einfluss steigender Temperaturen auf den Befallsverlauf der
Alternaria-Dürrfleckenkrankheit und die Immunantwort der
Kartoffelpflanze (KLIMA-KARTOFFEL)**

**Influence of increasing temperatures on the disease development
of *Alternaria* early blight and the immune response of the potato
plant (KLIMA-KARTOFFEL)**

gefördert durch

QS-Wissenschaftsfond Obst, Gemüse, Kartoffeln

Beteiligte Personen: M. Sc. Brune Carolin¹
Dr. agr. Nicole Bellé¹
Prof. Dr. rer. nat. Ralph Hückelhoven¹
Dr. agr. Johann Hausladen²

¹ Lehrstuhl für Phytopathologie, School of Life Sciences, Technische Universität München, Emil Ramann Str. 2, 85354 Freising

² Gewächshauslaborzentrum Dürnast, Plant Technology Center, Technische Universität München, Dürnast 9, 85354 Freising

Inhaltsverzeichnis

1. Zielsetzung	3
2. Hintergrund	3
3. Material und Methoden	3
3.1 Planung und Ablauf des ersten Durchgangs der Infektionsversuche im Gewächshaus	3
3.2 Planung und Ablauf des zweiten Durchganges der Infektionsversuche im Gewächshaus	5
3.3 Planung und Ablauf Laborarbeiten	7
4 Ergebnisse	7
4.1 Ergebnisse der Infektionsversuche 2022	7
4.2 Ergebnisse der Infektionsversuche 2023	9
4.3 Ergebnisse der Genexpressionsstudie	12
4.4 Ergebnisse zum Nachweis von <i>Alternaria solani</i>	14
5 Diskussion	14
6 Fazit	16
7 Ausblick	16
8 Abschlussarbeiten und Publikation	16
Referenzen	17

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zeitliche Abfolge der einzelnen Versuchsdurchläufe 2022	4
Tabelle 2: Geplanter Beprobungsumfang 2022	5
Tabelle 3: Zeitliche Abfolge der einzelnen Versuchsdurchläufe 2023	6
Tabelle 4: Geplanter Beprobungsumfang 2023	6
Tabelle 5: Probenauswahl für <i>A. solani</i> Nachweis	14

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Zeitlicher Ablauf eines Versuchsdurchlaufs in der ersten Wiederholung	4
Abbildung 2: Zeitlicher Ablauf eines Versuchsdurchlaufs in der zweiten Wiederholung	6
Abbildung 3: Nekrotische Blattfläche nach 7 Tagen 2022 Gruppe 1	8
Abbildung 4: Nekrotische Blattfläche nach 7 Tagen 2022 Gruppe 2	9
Abbildung 5: Nekrotische Blattfläche nach 7 Tagen 2023	11
Abbildung 6: Nekrotische Blattfläche nach 7 Tagen 2023 gemittelt	11
Abbildung 7: Farbkodierung der Gen-Regulierung des Pathogenese-bezogenen Proteins 2 dpi	12
Abbildung 8: Farbkodierung der Gen-Regulierung der Hitzeschock und Pathogenese-bezogenen Proteine 4 dpi	13

1. Zielsetzung:

Das Ziel dieser Studie war zu untersuchen, welchen Einfluss die Temperatur auf den Befallsverlauf der Dürrfleckenkrankheit, verursacht durch *A. solani*-Infektionen, in verschiedenen Kartoffelsorten hat. Das dient dazu, eine gezielte Einschätzung geben zu können, ob und ggf. wie sich das Krankheitsmanagement auf den Feldern an zukünftige Klimabedingungen anpassen muss. Zum anderen wollen wir analysieren, ob und wie sich Abwehrprozesse in der Pflanze bei unterschiedlichen Temperaturbedingungen verändern und so eine Infektion begünstigen oder verringern können. Das damit einhergehende Verständnis der Temperaturempfindlichkeit kann eine wichtige Entscheidungshilfe für die Züchtung von neuen Kartoffelsorten darstellen. Außerdem wurde untersucht, ob die verschiedenen Temperaturszenarien auf die Infektion mit verschiedenen *A. solani* Isolaten die gleiche Wirkung haben, oder ob es Isolat-spezifische Unterschiede gibt. Diese Ergebnisse tragen dazu bei, Veränderungen in der Populationsstruktur des Pathogens auf dem Feld besser abschätzen zu können.

2. Hintergrund:

In Vorversuchen konnte ein Einfluss verschiedener Temperaturstufen auf die Befallsentwicklung von Dürrflecken gezeigt werden. Dabei wurden zwei Kartoffelsorten (Kuras, Marabel), drei Temperaturstufen (18, 22, 26°C) und 4 verschiedene *A. solani* Isolate getestet. Hier konnte eine stärkere Befallsentwicklung mit steigenden Temperaturen beobachtet werden. Diese Steigerung unterschied sich zwischen den einzelnen *A. solani* Isolaten und zum Teil auch zwischen den beiden Sorten. Dies führte zu der Hypothese, dass es sich um eine Genotyp-Genotyp-Umwelt-Interaktion zwischen Temperatur, Sorte und einzelnen *A. solani* Isolaten handelt.

3. Material und Methoden

3.1 Planung und Ablauf des ersten Durchgangs der Infektionsversuche im Gewächshaus

Für den ersten Teil des Forschungsprojektes wurden 6 verschiedene Kartoffelsorten und 5 unterschiedliche *Alternaria solani* Isolate verwendet. Alle Kartoffelpflanzen wurden als Augenstecklinge vermehrt und sind zum Zeitpunkt der Versuchsdurchführung 6 Wochen alt. Für jede Kombination aus Sorte x *A. solani* Isolat x Temperatur wurden jeweils drei Pflanzen verwendet. Von jeder Versuchsreihe wurden vor der Inokulation und jeweils zwei, fünf und sieben Tage nach der *Alternaria* Inokulation Blattproben genommen (Abb. 1). Dabei wurde jede Pflanze einzeln beprobt. Die Blattproben wurden direkt nach dem Abschneiden in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend bei -70°C gelagert. Eine Befallsbonitur fand jeweils direkt vor der Probenahme statt. Um ein optimales Mikroklima in den Klimakammern zu schaffen, wurden die sechs Sorten in zwei Gruppen aufgeteilt, da die Pflanzen sonst sehr eng in den Kammern stehen müssten (Tab. 1). In der ersten Gruppe wurden die Sorten Sevim, Simonetta und Kuras getestet und in der zweiten Gruppe Musica, Marabel und Juwel. Zusätzlich wurde in der zweiten Gruppe eine Variante der Sorte Kuras hinzugefügt, die mit dem *A. solani* Isolat 803_1 infiziert und anschließend bei 23°C kultiviert wurde. Diese Variante diente der Vergleichbarkeit der beiden Gruppen und sollte auch bei der Genexpressionsstudie herangezogen werden. Um eine *Alternaria*-Infektion zu fördern, wurden alle Pflanzen direkt nach der Inokulation für 48h in Infektionszelte gestellt, in denen nahezu 100% rel. Luftfeuchtigkeit gewährt werden sollte. Diese Infektionszelte wurden am Gewächshauslaborzentrum Dürnast der Technischen

Universität München neu angeschafft und mittels Hochdruckvernebelung in regelmäßigen Zeitabständen befeuchtet. Die Temperatur war dabei auf 23 bis 24°C eingestellt. Nach 48h wurden alle Pflanzen entsprechend in die verschiedenen Klimakammern aufgeteilt und die Befallsentwicklung beobachtet. Die Temperaturbedingungen in den Klimakammern am Tag (7.00 Uhr bis 22.00 Uhr) waren 18, 23 und 28 °C, in der Nacht (ab 22.00 Uhr) wurde die Temperatur bei allen Kammern innerhalb einer Stunde auf 18°C abgesenkt.

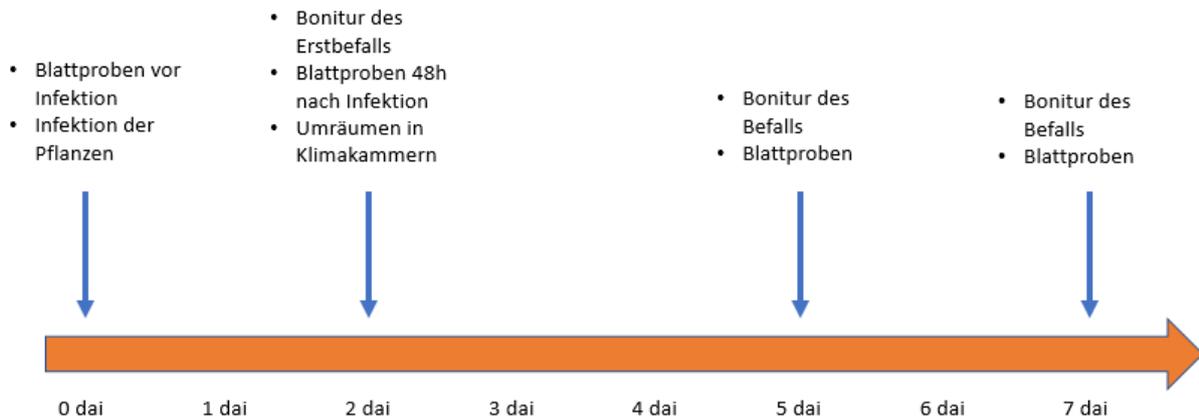


Abbildung 1 Zeitlicher Ablauf eines Versuchsdurchlaufs in der ersten Wiederholung

Für jeden Durchgang wurden fünf *A. solani* Isolate (615, 720_3, 754_2, 774_1 und 803_1) auf SNA-Agar vermehrt. Teilweise konnten nicht alle Isolate verwendet werden, da manche Platten eine bakterielle Kontamination aufwiesen (Tab.1).

Tabelle 1 Zeitliche Abfolge der einzelnen Versuchsdurchläufe. Rot markierte Isolate konnten aufgrund von bakteriellen Kontaminationen nicht getestet werden.

Gewächshausversuch	Sorten	Isolate	Durchführung
GHV I	Sevim, Simonetta, Kuras	615, 720_3 ² , 754_2, 774_1, 803_1	24.01.-31.01.2022
GHV II	Musica, Marabel, Juwel, Kuras ¹	615, 720_3, 754_2, 774_1, 803_1	07.02.-14.02.2022
GHV III	Sevim, Simonetta, Kuras	615, 720_3, 754_2, 774_1, 803_1 ²	14.02.-21.02.2022
GHV IV	Sevim, Simonetta, Kuras	615, 720_3, 754_2, 774_1, 803_1	28.02.-07-03.2022
GHV V	Musica, Marabel, Juwel, Kuras ¹	615, 720_3, 754_2, 774_1, 803_1	07.03.-14.03.2022
GHV VI	Musica, Marabel, Juwel, Kuras ¹	615, 720_3, 754_2, 774_1, 803_1	21.03.-28.03.2022

¹Dient als Referenz zu anderen Durchläufen. Wurde nur mit dem Isolat 803_1 infiziert und bei 23°C kultiviert.

²Nur bei Simonetta und Kuras getestet.

Der Probenumfang richtete sich jeweils nach dem Zeitpunkt, zu dem beprobt wurde (Tab.2). Vor der *A. solani* Inokulation wurden drei Pflanzen von jeder Sorte beprobt, um ein Bild der Ausgangssituation zu bekommen. Diese Pflanzen wurden im weiteren Verlauf des Versuchs den unbehandelten Kontrollen zugeordnet. Zwei Tage nach der *A. solani* Inokulation wurden von jeder Sorte in Kombination mit jedem *A. solani* Isolat Blattproben genommen. Am fünften und siebten Tag nach der Inokulation wurden dann alle Sorten mit jedem Isolat in jeder der drei Klimakammern beprobt.

Tabelle 2: Geplanter Beprobungsumfang pro Versuchsdurchlauf für Gruppe eins (Sevim, Simonetta, Kuras). Für Gruppe zwei (Musica, Marabel, Juwel) kommen jeweils noch 6 Proben für die Referenzvariante hinzu).

Beprobung	Beprobte Varianten	Probenanzahl
0 dai	Unbehandelte Kontrolle (Vor Inokulation, Temperatur bei allen noch gleich)	9 Proben (3 Sorten x 3 Pflanzen)
2 dai	Unbehandelte Kontrolle + alle Isolate (Temperatur bei allen noch gleich)	45 Proben (3 Sorten x 5 Isolate x 3 Pflanzen)
5 dai	Unbehandelte Kontrolle + alle Isolate + alle Temperaturen	135 Proben (3 Sorten x 5 Isolate x 3 Temperaturen x 3 Pflanzen)
7 dai	Unbehandelte Kontrolle + alle Isolate + alle Temperaturen	135 Proben (3 Sorten x 5 Isolate x 3 Temperaturen x 3 Pflanzen)

Die gesammelten Blattproben dienen zusammen mit den Boniturwerten der Befallsverläufe als Grundlage für den zweiten Teil des Forschungsvorhabens.

3.2 Planung und Ablauf des zweiten Durchganges der Infektionsversuche im Gewächshaus

Im Januar und Februar 2023 wurde ein weiterer Durchgang der Infektionsversuche in Anlehnung an die Vorversuche durchgeführt. In diesem Fall wurden zwei Kartoffelsorten, Kuras und Marabel, gegen drei *A. solani* Isolate (754_2, 774_1, 803_1) getestet. Es wurden dabei erneut drei Temperaturstufen (18, 22 und 26 °C) getestet. Die Temperatur in den Klimakammern waren bei dieser Versuchsserie konstant, keine Nachtabsenkung der Temperatur. Jede Sorte x Isolat x Temperatur Interaktion wurde anhand von vier Einzelpflanzen untersucht. Für die jeweilige Wiederholung wurden 6 Wochen alte Pflanzen mit *A. solani* infiziert, in einem Infektionszelt inokuliert, in Klimakammern aufgeteilt und zu diversen Zeitpunkten nach der Inokulation bonitiert und beprobt (Abb. 2). Während die Befallsentwicklung zu ähnlichen Zeitpunkten bonitiert wurde, wurde der Probenumfang stark reduziert. Die Beprobung der Pflanzen für die Genexpressionsstudie beschränkte sich also auf den zweiten Tag nach der Inokulation, bevor die Pflanzen in die Kammern aufgeteilt wurden und auf 4 Tage nach der Inokulation. Zu diesem Zeitpunkt standen die Pflanzen bereits zwei Tage in den entsprechenden Kammern, was diese Proben für den Test auf Hitzestress eignet.

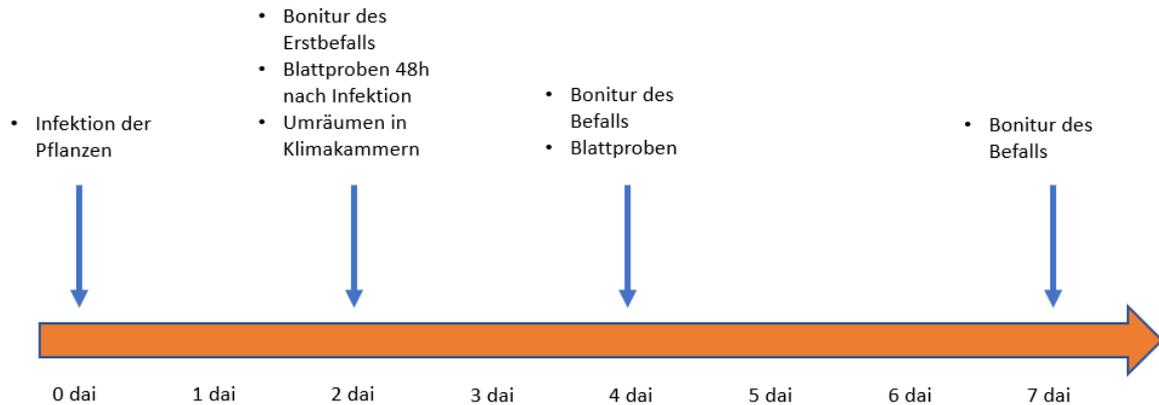


Abbildung 2: Zeitlicher Ablauf eines Versuchsdurchlaufs in der zweiten Wiederholung

Die Reduktion der Sorten und Pilz-Isolate in dem zweiten Durchgang 2023 machte es möglich, in drei Wiederholungen jeweils beide Sorten parallel zu testen (Tab. 3)

Tabelle 3: Zeitliche Abfolge der einzelnen Versuchsdurchläufe. Rot markierte Isolate konnten aufgrund von bakteriellen Kontaminationen nicht getestet werden.

Gewächshausversuch	Sorten	Isolate	Durchführung
GHV I	Marabel, Kuras	754_2, 774_1, 803_1	09.01. – 16.01.2023
GHV II	Marabel, Kuras	754_2, 774_1, 803_1	23.01. – 30.01.2023
GHV III	Marabel, Kuras	754_2, 774_1, 803_1	06.02. – 13.02.2023

Der Probenumfang unterschied sich zu den beiden Zeitpunkten, da lediglich bei dem zweiten Zeitpunkt ein Temperaturunterschied herrschte. So wurden die Proben am zweiten Tag nach der Inokulation entsprechend der Sorte x Isolat Interaktion gepoolt. Am zweiten Zeitpunkt wurden dann jeweils die Pflanzen in den Kammern beprobt, sodass 24 Proben pro Versuchsdurchlauf genommen wurden. In beiden Fällen wurden die Blätter der vier Einzelpflanzen als eine Mischprobe genommen (Tab. 4).

Tabelle 4: Geplanter Beprobungsumfang pro Versuchsdurchlauf

Beprobung	Beprobte Varianten	Probenanzahl
2 dai	Unbehandelte Kontrolle + alle Isolate (Temperatur bei allen noch gleich)	8 Proben (2 Sorten x 4 Isolate, gepoolt)
4 dai	Unbehandelte Kontrolle + alle Isolate + alle Temperaturen	24 Proben (2 Sorten x 4 Isolate x 3 Temperaturen)

3.3 Planung und Ablauf Laborarbeiten

Die gesammelten Blattproben wurden im Labor für eine Genexpressionsstudie verwendet. Da die phänotypischen Ergebnisse des ersten Durchgangs 2022 nur geringe Infektionserfolge zeigten, wurde die geplante Studie mit den Proben aus dem Jahr 2023 durchgeführt.

Für die Durchführung der Genexpressionsstudie wurden die Proben im Labor mit flüssigem Stickstoff gemörsert und daraus die RNA extrahiert. Nach anschließender cDNA-Synthese wurden die Genexpression von mehreren Genen mittels RT qPCR gemessen. Als Kontrollwert wurde dabei die jeweilige Expression des *housekeeping* Gens StEF-1alpha (Nicot et al., 2005) genutzt. Für die Reaktion auf den möglichen Hitzestress und als Marker für eine Pathogen assoziierte Reaktion (Pathogenese-bezogenes Protein) wurde jeweils ein Gen getestet. Für die abiotische Stressreaktion war das in unserem Fall das Gen StHSP90 (Sołtys-Kalina et al., 2015). Das getestete Gen eines Pathogenese-bezogenes Proteins war StPR-1b (Baebler et al., 2011). In Vortests zu dieser Studie wurden außerdem weitere Primer Paare für Gene bezogen auf Hitzestress und Pathogenese-bezogenes Proteine getestet, diese konnten jedoch nicht erfolgreich implementiert werden.

Im Falle der Proben ohne Temperatur-Einfluss (2 dai) wurde lediglich die Genexpression des Pathogenese-bezogenes Proteins getestet. Für die Proben vom 4. Tag nach der Inokulation wurden beide Gene untersucht. In beiden Fällen wurde die Gen-Regulation mit einer Kontrolle verglichen. Für die Reaktion auf den Hitzestress wurden die 18 °C Varianten genutzt, für die Regulierung des Pathogenese-bezogenes Genes die nicht inokulierten Varianten (UT).

Aufgrund von nekrotischer Blattfläche in einigen unbehandelten Kontrollen, wurde zusätzlich mit einer Auswahl der Proben eine Standard PCR durchgeführt. Durch diesen Test von einigen auffälligen Proben sollte ein Befall der nicht infizierten Pflanzen mit *A. solani* ausgeschlossen werden. Gleichzeitig konnte so untersucht werden, ob die Proben der infizierten Pflanzen tatsächlich *A. solani* enthielten.

4. Ergebnisse:

4.1 Ergebnisse der Infektionsversuche 2022

Für die erste Gruppe mit den Sorten Kuras, Sevim und Simonetta zeigt sich für den *Alternaria*-Befall nach sieben Tagen über die drei Wiederholungen ein sehr inhomogenes Bild (Abb. 3). Die Befallsintensität ist zum Teil sehr unterschiedlich. Für die Sorte Kuras wurden in der ersten Wiederholung zwischen 2 und 5 % Befall bonitiert, in der zweiten Wiederholung nur vereinzelt 1 % und in der dritten zwischen 2 und 12 %, je nach Isolat. In vorangegangenen Versuchen lagen die Infektionen durchschnittlich bei 25 bis über 80 %. Die unbehandelten Kontrollpflanzen blieben in allen drei Versuchsreihen nahezu symptomfrei. Die Kontrollpflanzen der Sorte Sevim zeigten in unterschiedlichem Ausmaß Blattflecken, die nicht eindeutig von *Alternaria*-Symptomen unterschieden werden konnten. Daher kann auch der dritte Durchgang mit der Sorte Sevim nicht gewertet werden, da hier die Kontrollpflanzen bereits 5 bis 25 % unspezifische Blattflecken aufwiesen. Eine DNA-Analyse könnte in so einem Fall genauere Daten liefern. In den beiden ersten Durchgängen mit der Sorte Sevim wurden insgesamt niedrige Befälle zwischen 1 und 7 % beobachtet. Bei der Sorte Simonetta kam es nur vereinzelt zu Blattflecken auf den unbehandelten Kontrollen, doch auch hier war die Befallsintensität bei den *A. solani* infizierten Pflanzen insgesamt sehr gering mit ca. 1-10 %.

Es konnten für diese Gruppe keine eindeutigen Trends hinsichtlich der Temperatur festgestellt werden. Es ist jedoch festzuhalten, dass sich die Sorte Sevim nur bedingt für weitere Gewächshausversuche eignet, da hier vermehrt physiologische Blattflecken auf den unbehandelten Pflanzen aufgetreten sind. In diesem Versuchsdurchgang wurde jedoch keine DNA-Analyse durchgeführt, um mit Sicherheit ausschließen zu können, dass es sich bei solchen Flecken nicht doch um eine Querkontamination mit *Alternaria* handelt.

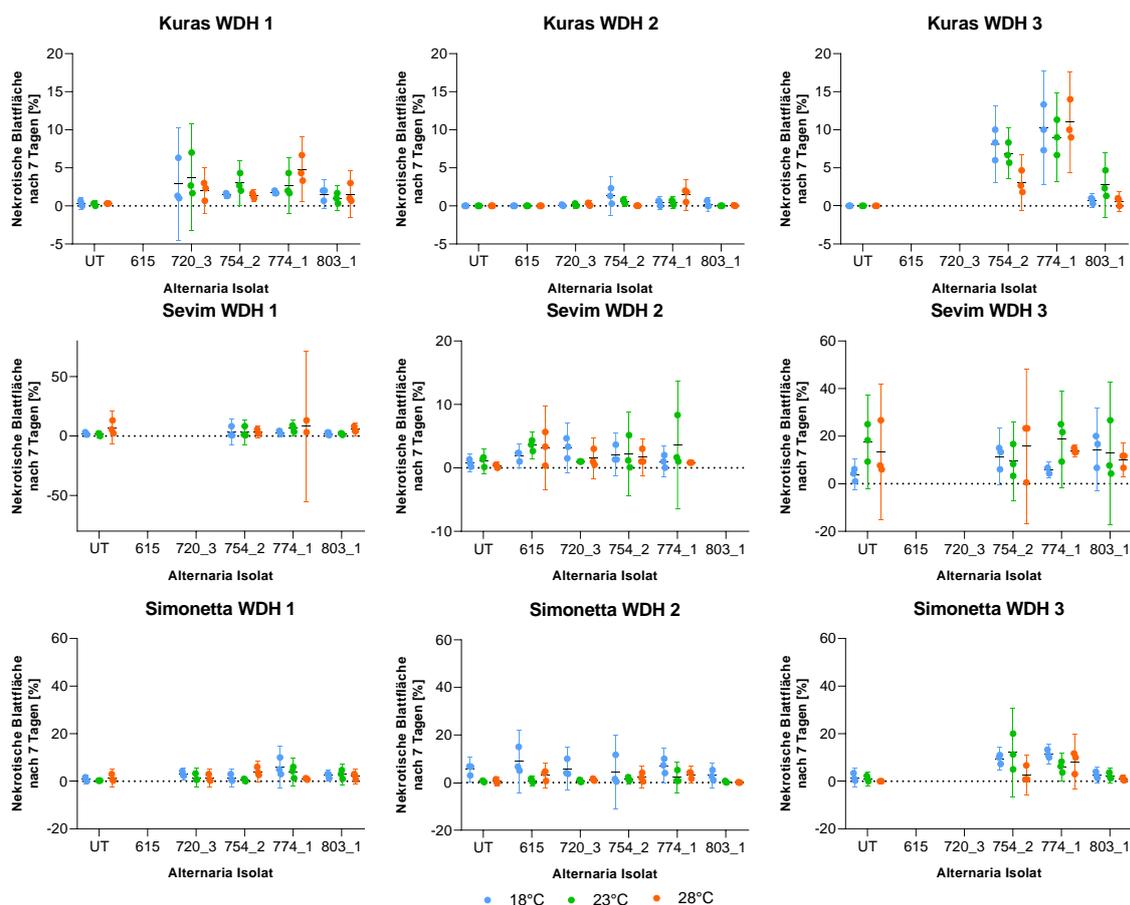


Abbildung 3: Nektrotische Blattfläche nach 7 Tagen [%] der Sorten Kuras, Sevim und Simonetta. Angegebene Temperaturen zwischen 7 und 22 Uhr, Absenkung der Temperatur zwischen 22 und 7 Uhr auf 18 °C in allen Varianten. Manche Isolate konnten nicht für alle Durchgänge verwendet werden, daher wird dort kein Befall angezeigt. UT = Unbehandelte Kontrolle

In der zweiten Gruppe wurden die Sorten Juwel, Marabel und Musica verwendet. Hier wurden sowohl für den ersten als auch für den letzten Durchgang über alle drei Sorten hinweg sehr geringe Befallswerte zwischen 1 und 2% nach 7 Tagen bonitiert (Abb. 4). Da auf diesem Level eine visuelle Bonitur schwierig ist, können die beiden Durchgänge nur bedingt in die Auswertung mit aufgenommen werden. Auch hier könnte eine DNA-Analyse verlässlichere Daten liefern. In dem zweiten Durchgang konnte bei der Sorte Marabel insgesamt eine etwas höhere Befallsintensität erreicht werden, wobei die nekrotische Blattfläche zwischen 1 und 30% schwankte. Die unbehandelten Kontrollen wiesen im ersten und letzten Durchgang bei allen drei Sorten vereinzelt auch Blattflecken auf, die nicht von einer *Alternaria* Infektion zu unterscheiden waren. Auf niedrigem Befallsniveau lässt sich in dem zweiten Durchgang ein leichter Trend erkennen, dass das Isolat 754_2 bei den Sorten Juwel und Musica

lediglich bei 28°C zu einem Befall geführt hat. Ebenso konnte für das Isolat 774_1 nur bei 28°C bei der Sorte Juwel ein Befall beobachtet werden. Bei der Sorte Marabel zeigten sich im zweiten Durchgang keine eindeutigen Trends.

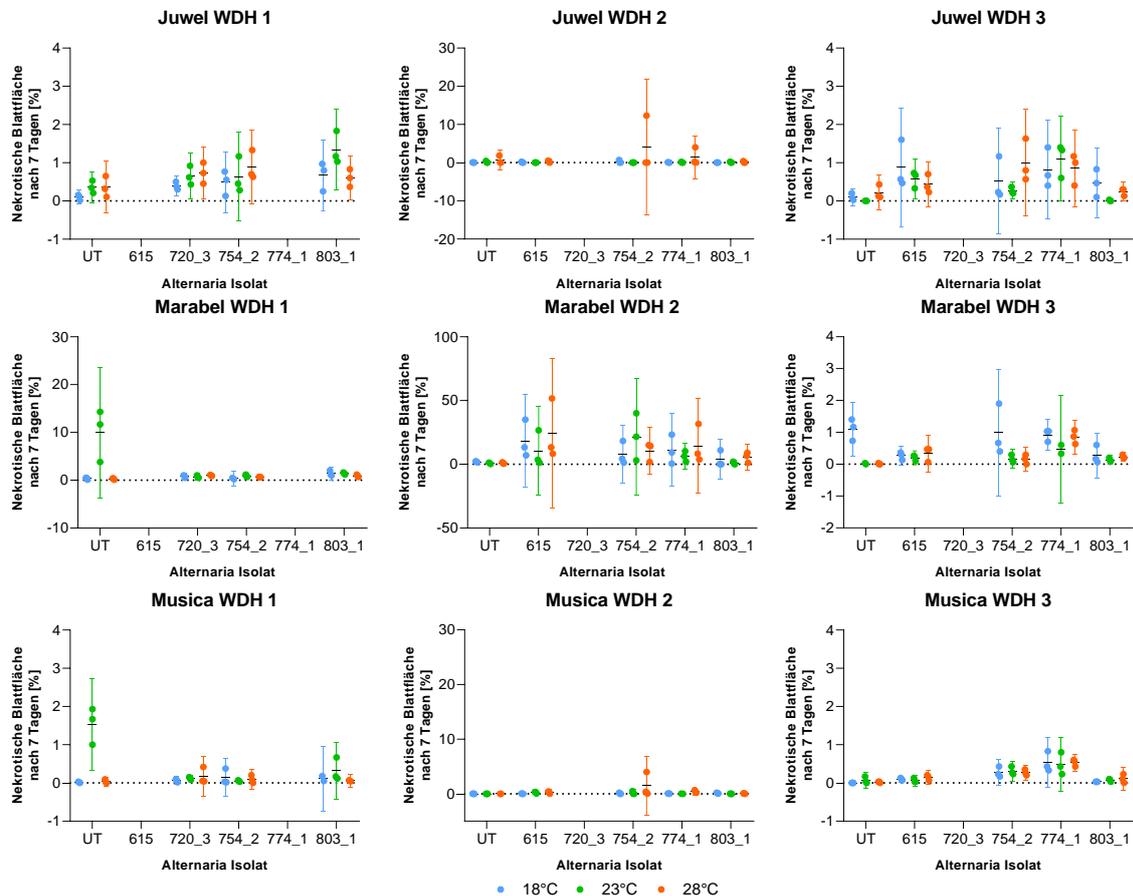


Abbildung 4: Nektrotische Blattfläche nach 7 Tagen [%] der Sorten Juwel, Marabel und Musica. Angegebene Temperaturen zwischen 7 und 22 Uhr, Absenkung der Temperatur zwischen 22 und 7 Uhr auf 18 °C in allen Varianten. Manche Isolate konnten nicht für alle Durchgänge verwendet werden, daher wird dort kein Befall angezeigt. UT = Unbehandelte Kontrolle

4.2 Ergebnisse der Infektionsversuche 2023

In der Versuchsreihe II zeigt sich eine deutlich gesteigerte Befallsstärke im Vergleich zu 2022. Für die Sorte Kuras ist in den drei Wiederholungen eine Infektion von bis zu 15 % zu beobachten. Im zweiten Durchgang ist die Infektion insgesamt etwas geringer, hier werden lediglich Boniturwerte von bis zu 5 % vermerkt mit einzelnen Ausreißern bis 15 %. Im ersten und dritten Durchgang führte die Inokulation mit den Isolaten 754_2 und 774_1 jedoch zu einer stärkeren Befallsentwicklung von 5 bis 15 %. Ähnlich wie im Vorjahr ist auch in diesem Fall wieder eine Entwicklung von nekrotischen Blattflecken in der nicht infizierten Kontrolle zu beobachten, die optisch nicht von Alternaria-Blattflecken zu unterscheiden sind. Dies gilt insbesondere für den zweiten Durchgang, da es hier Ausreißer mit bis zu 15 % nekrotischer Blattfläche gibt und die unspezifischen Flecken insgesamt auf einem ähnlichen Level sind wie die bonitierten Symptome der infizierten Varianten. Dies gilt ebenfalls für die unbehandelte und die mit Isolat 803_1 infizierte Variante in Durchgang 1.

Trotzdem sind insbesondere in den Wiederholungen 1 und 3 Trends zu erkennen. Die Infektion mit den Isolaten 754_2 und 774_1 führte dabei in der 26 °C Kammer zu einer leicht erhöhten Symptomentwicklung. Hier sind also Isolat-Unterschiede und der Einfluss der höheren Temperaturen in einer Tendenz zu erkennen. Dies ist trotz der vergleichsweisen hohen Streuung der Daten auch im mittleren Befall über alle drei biologischen Replikate hinweg zu erkennen (Abb. 6).

Insgesamt zeigen sich also auch bei einer geringeren Befallsstärke in der Sorte Kuras Unterschiede in der Pflanze x Pathogen x Umwelt Interaktion. Dies ist besonders für die Alternaria Isolate mit einem höheren Infektionserfolg zu erkennen. Aufgrund der geringen bis mittleren Befallsstärke, kombiniert mit den Ergebnissen der Versuche aus dem Jahr 2022, könnte eine weitere Wiederholung der Versuche unter weiter optimierten Bedingungen die hier erkennbaren Tendenzen deutlicher machen.

In der Sorte Marabel war insgesamt ein höheres Vorkommen nekrotischer Blattflecken zu beobachten. Allerdings beinhalteten die Boniturergebnisse auch ein Auftreten von Blattflecken in der unbehandelten Kontrolle auf einem ähnlichen mittleren Level wie in den infizierten Varianten. Dies war vor allem in Durchgang 1 und teilweise in Durchgang 2 und 3 zu beobachten. Zusätzlich zu den unklaren Ergebnissen der Infektionen, sind hier weniger Trends bezüglich des Temperatureinflusses zu erkennen. In Wiederholung 2 sehen wir den erwarteten Einfluss der höheren Temperaturen nach einer Inokulation mit den Isolaten 774_1 und 803_1. Dabei sind die Unterschiede unter den verschiedenen Temperaturen und die Höhe der Infektion gesteigert im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Dies lässt einen tatsächlichen Infektionserfolg und den erwarteten Einfluss der Temperatur vermuten. Diesen Effekt sehen wir erneut in Wiederholung 3 für das Isolat 774_1. Eine klare Interpretation der Ergebnisse ist durch die unspezifischen Blattflecken nur schwer möglich. Die nachfolgenden Ergebnisse einer PCR-Analyse geben zusätzlich Hinweise auf eine Kreuzkontamination der Kontrollen in der Sorte Marabel.

Insgesamt ist also auch hier ein Isolat-spezifischer Effekt zu erkennen und in zwei der drei Wiederholungen auch ein Temperatur-Effekt bei einer Infektion mit dem Isolat 774_1. Gemittelt über alle drei Wiederholungen ist die Streuung der Daten vergleichsweise hoch. Jedoch ist trotz höherer Streuung ein Trend sichtbar, dass höheren Temperaturen zu einer Entwicklung von mehr Blattflecken führen (Abb. 6).

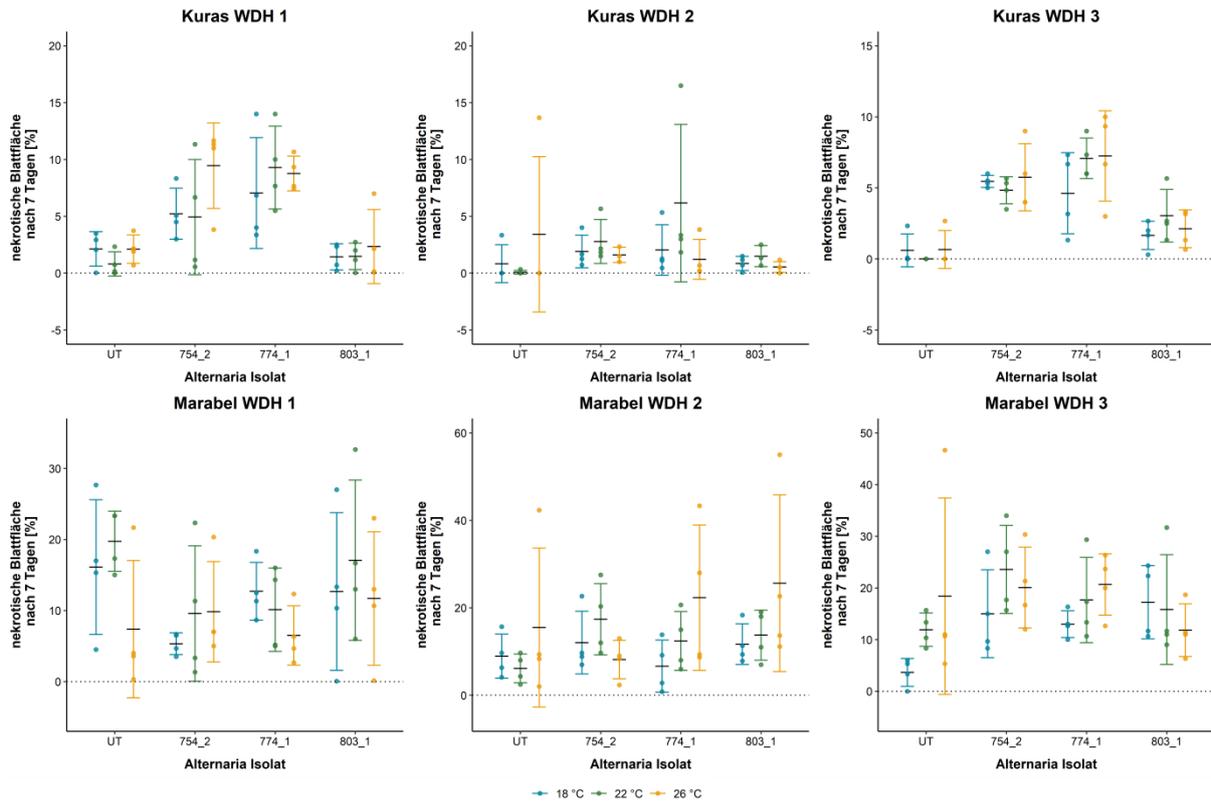


Abbildung 5: Nekrotische Blattfläche nach 7 Tagen [%] der Sorten Kurask und Marabel in den einzelnen Versuchswiederholungen. Angegebene Temperaturbedingungen konstant ab Tag 2 nach der Inokulation. UT = Unbehandelte Kontrolle

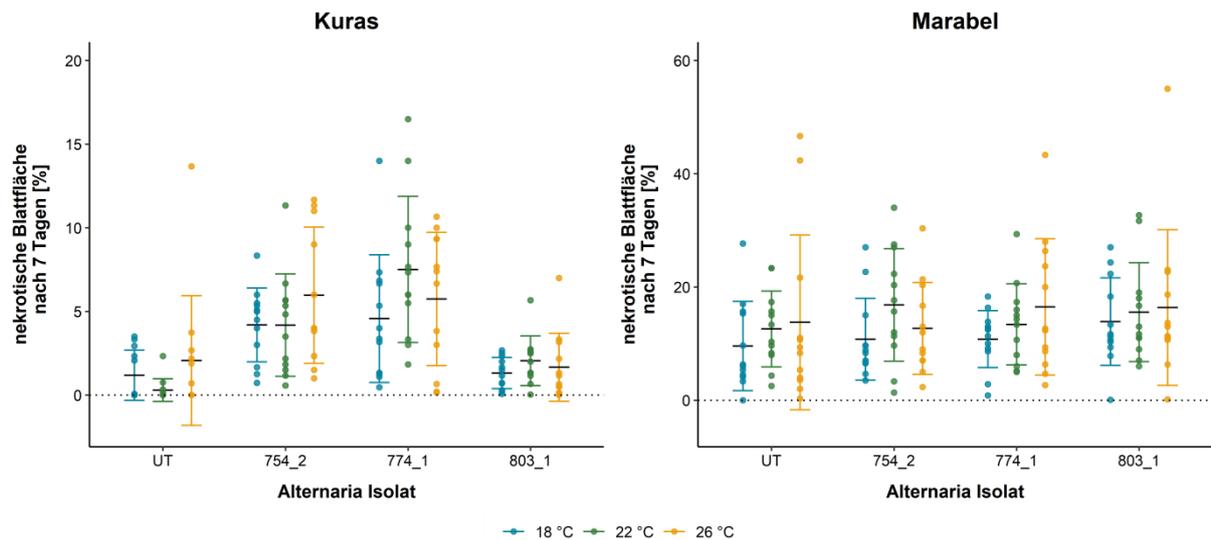


Abbildung 6: Nekrotische Blattfläche nach 7 Tagen [%] der Sorten Kurask und Marabel gemittelt über die drei Versuchswiederholungen. Angegebene Temperaturbedingungen konstant ab Tag 2 nach der Inokulation. UT = Unbehandelte Kontrolle

4.3 Ergebnisse der Genexpressionsstudie

Die Ergebnisse aus der Genexpressionsstudie sind in den Abbildungen 7 und 8 dargestellt. Für die Proben zwei Tage nach der Inokulation wurde lediglich die Regulation des Pathogenese-bezogenen Protein-Gens ausgewertet, da die Pflanzen zu diesem Zeitpunkt noch unter gleichen Temperaturbedingungen standen. Dabei zeigt sich, dass im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle eine Hochregulierung des Gens bei fast allen *Alternaria* Behandlungen und in beiden Sorten stattgefunden hat. Die einzige Ausnahme ist dabei die Sorte Kurasa, infiziert mit dem Isolat 803_1. Diese Variante zeigt eine leicht runter regulierte Genexpression. Insgesamt sind in beiden Sorten Isolat-spezifische Unterschiede in der Genexpression sichtbar. Auffällig sind außerdem die entgegengesetzten Reaktionen der beiden Kartoffel Sorten. Während die Genexpression in der Sorte Kurasa am stärksten nach einer Inokulation mit dem Isolat 774_1 hoch reguliert wird, sind es bei der Sorte Marabel eher die Isolate 754_2 und 803_1 die eine erhöhte Genexpression auslösen.

Allerdings ist zu beachten, dass diese Daten auf den Proben von einer Versuchswiederholung basieren. Die Auswertung weiterer Durchgänge würde zu verlässlicheren, reproduzierbaren Daten führen.

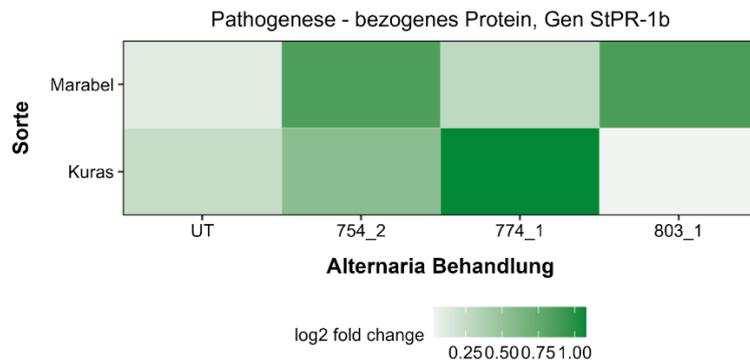


Abbildung 7: Farbkodierung der Gen-Regulierung des Pathogenese-bezogenen Proteins im Verhältnis zur nicht infizierten Kontrolle (UT) an Tag 2 nach der Inokulation. Darstellung mit log2 Normalisierung

Die Proben vom vierten Tag nach der Inokulation wurden hinsichtlich ihrer Genexpression beider Proteine untersucht. Als Vergleich dienten hier zwei verschiedene Varianten. Für die Reaktion auf die veränderte Temperatur wurden die Proben aus der 18 °C Kammer als Referenz genutzt. Die Ergebnisse der Genexpression (Abb. 8 A) zeigen, dass die Sorte Kurasa insgesamt stärker auf die veränderte Temperatur reagierte als die Sorte Marabel. Besonders auffällig ist dabei jedoch, dass die Genexpression nach zwei Tagen bei 22 °C stärker hoch reguliert ist als bei 26 °C. Die Ausnahme ist die Behandlungsvariante mit dem Isolat 754_2 bei dem keine Veränderung der Genexpression zu erkennen ist. Das Gegenteil wurde in der Sorte Marabel erfasst. Hier zeigt die Variante der 754_2 Infektion bei 26 °C die stärkste Hoch-Regulation des Hitzeschock Protein Genes. Außerdem ist für die Sorte Marabel, infiziert mit den Isolaten 774_1 oder 803_1, der gleiche Trend wie bei der Sorte Kurasa zu erkennen, dass die Genexpression bei 22 °C stärker hoch reguliert wird als bei 26 °C. In den Proben der unbehandelten Marabel Pflanzen ist kein Einfluss der Temperatur zu erkennen.

Für die Genexpression des Pathogenese-bezogenen Proteins wurde die unbehandelte Kontrolle als Referenz verwendet. In der Sorte Marabel zeigt sich dabei die deutlichsten Veränderungen bei 22 °C. Unabhängig von der Alternaria Behandlung wurde die Genexpression runter reguliert. Außerdem verhielten sich die Proben aus den Behandlungs-Varianten mit den Isolaten 754_2 und 803_1 bei 18 und 26 °C jeweils ähnlich. Die mit dem Isolat 754_2 infizierten Pflanzen zeigten eine leicht verringerte Genexpression, während das untersuchte Gen nach der Behandlung mit Isolat 803_1 unter beiden Temperaturbedingungen leicht herauf reguliert wurde. Das vermutlich deutlichste Ergebnis zeigt sich allerdings für die Genexpression des Pathogenese-bezogenen Proteins in der Sorte Kuras. In dieser Sorte ist nur ein sehr geringer Einfluss des Alternaria Isolates zu erkennen, dafür eine umso deutlichere Reaktion auf die Temperatur. Die Regulation nimmt dabei deutlich ab, je wärmer die Umgebung der Kammer war. Bei 18 °C ist das Gen deutlich hoch reguliert. Eine leichte Erhöhung der Temperatur auf 22 °C führte noch immer zu einer Hochregulierung des Genes, jedoch geringer als bei 18 °C. Im Gegensatz dazu zeigt sich bei einer Temperatur von 26 °C eine herabregulierte Genexpression. Dies lässt einen negativen Effekt der gesteigerten Temperatur auf die Abwehr der Pflanzen vermuten. Dieses Ergebnis könnte die in einigen Varianten gesteigerte Infektionsstärke bei höheren Temperaturen erklären.

Wie auch bei den Ergebnissen der Infektionsstärke im Gewächshaus und der Genexpression nach 2 Tagen würde diese Untersuchung von einem ergänzten Datensatz profitieren.

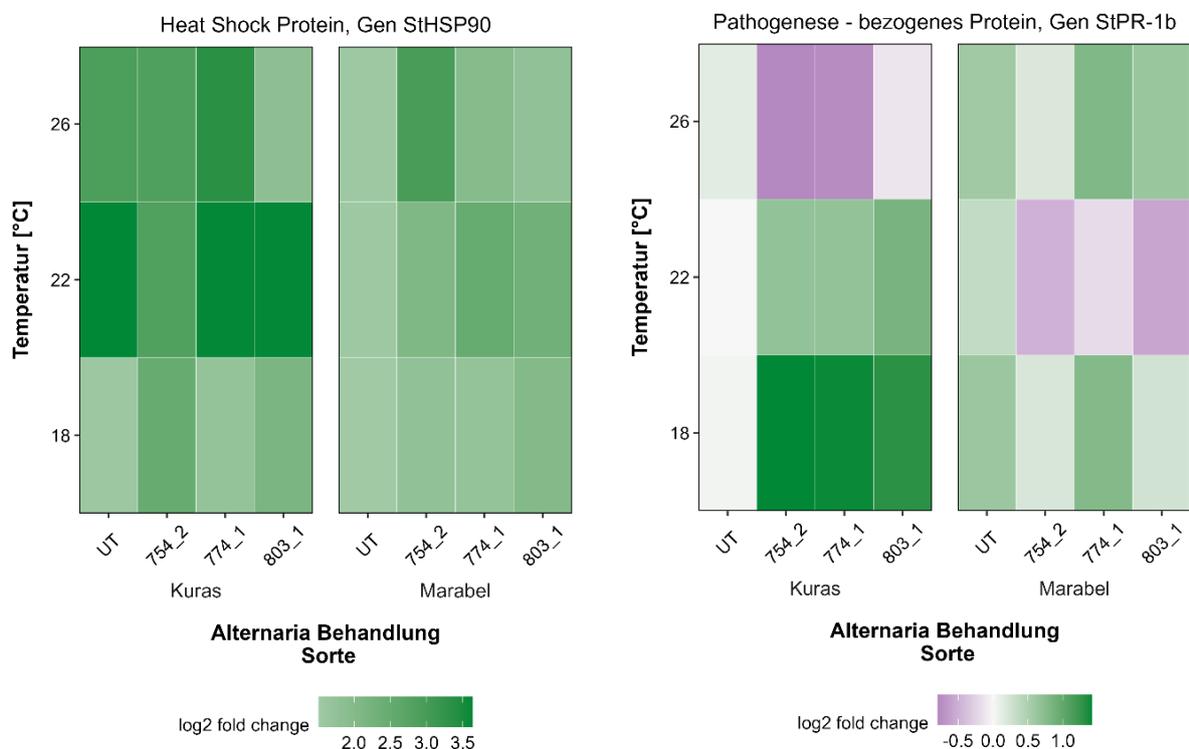


Abbildung 8: Farbkodierung der Gen-Regulierung der Hitzeschock und Pathogenese-bezogenen Proteine im Verhältnis zur 18 °C bzw. nicht infizierten Kontrolle (UT) an Tag 4 nach der Inokulation. Darstellung mit log2 Normalisierung

4.4 Ergebnisse zum Nachweis von *Alternaria solani*

Für den Nachweis wurden ausgewählte Proben genutzt, in denen Symptome sichtbar waren. Dabei handelte es sich sowohl um infizierte als auch unbehandelte Proben. Es wurden vor allem Proben der Sorte Marabel untersucht, da hier vermehrt nekrotische Blattflecken zu sehen waren, die nicht von *Alternaria* Symptomen zu unterscheiden waren. Die Liste der Proben ist in Tabelle 5 aufgeführt.

Tabelle 5: Probenauswahl für *A. solani* Nachweis

Probennr.	Sorte	<i>A. solani</i> Isolat	Temperatur
29	Marabel	unbehandelt	18 °C
30	Marabel	774_1	18 °C
37	Marabel	unbehandelt	22 °C
39	Marabel	754_2	22 °C
57	Kuras	unbehandelt	22 °C
77	Marabel	unbehandelt	18 °C
79	Marabel	754_2	18 °C
93	Marabel	unbehandelt	26 °C
96	Marabel	803_1	26 °C
125	Marabel	unbehandelt	18 °C
127	Marabel	754_2	18 °C
137	Kuras	unbehandelt	26 °C
138	Kuras	774_1	26 °C
139	Kuras	754_2	26 °C

Für die Proben der Sorte Kuras ist zu erkennen, dass keine der unbehandelten Proben *Alternaria solani* enthielt. Die Ergebnisse der PCR für die Proben der Sorte Marabel sehen anders aus, da hier auch in einigen der unbehandelten Varianten *A. solani* DNA nachweisbar war, was auf eine Kreuzkontamination schließen lässt.

5. Diskussion

Die Ergebnisse aus beiden Versuchen ergeben insgesamt weitere Anhaltspunkte, dass eine erhöhte Temperatur das Infektionsgeschehen begünstigt. Einige Ergebnisse erschweren allerdings die Interpretation der Daten. Zum einen waren sowohl in den Versuchen 2022 als auch im zweiten Durchgang 2023 die Infektionserfolge vergleichsweise niedrig. Diese niedrigen Infektionserfolge machen eine erneute Evaluierung der Methodik notwendig. Ansatzpunkte für eine verbesserte Infektion könnten beispielsweise in der Auswahl der *Alternaria solani* Isolate und der Sporenkonzentration liegen. Trotz der insgesamt niedrigen Infektionserfolge zeigte sich der Unterschied, den die Auswahl der Isolate machen kann. Das Isolat 803_1 zeigte in beiden Durchgängen und auf mehreren Sorten den geringsten Infektionserfolg. Die Auswahl dieses schwächer pathogenen Isolates behindert allerdings die Beurteilung anderer Einflüsse, wie in diesem Fall der Temperatur. Auch die Isolate 754_2 und 774_1, die in der Vergangenheit zu stärkeren Infektionen führten, verursachten im zweiten Durchgang eine maximale nekrotische Blattfläche von 15-25 %. Diese Ergebnisse lassen

vermuten, dass die gewählte Sporenkonzentration nicht immer ausreichend ist, um einen hohen Infektionsgrad zu erzielen.

Eine zusätzliche Schwierigkeit, die sich im zweiten Versuchsdurchgang vor allem in der Sorte Marabel zeigte, ist das Auftreten von unspezifischen Blattflecken, die nicht von *A. solani* Symptomen zu unterscheiden sind. Die Ergebnisse der PCR zeigten eine Kreuzkontamination der Kontrollen für einige der Proben. Allerdings waren auch Proben vorhanden, in denen durch PCR kein *A. solani* nachgewiesen werden konnte. Ein genauerer Einblick wäre hier durch eine deutlich umfangreichere Untersuchung mittels qPCR möglich. Durch die Quantifizierung der *A. solani* DNA im Verhältnis zur Kartoffel DNA wäre eine Abschätzung des tatsächlichen Befalls möglich. Kreuzkontaminationen könnten durch eine Reduzierung der Pflanzenanzahl verhindert werden. In der Inkubationsphase in den Infektionszelten herrschen optimale Bedingungen für das Wachstum des Pathogens und bei einem zu geringen Abstand der Pflanzen kann auch bei größter Sorgfalt eine Kreuzkontamination nicht immer vollständig verhindert werden. Blattflecken, die nicht auf eine Kreuzkontamination zurückzuführen sind, würden in der DNA-Analyse nicht zu Buche schlagen und so eine bessere Interpretation der Ergebnisse möglich machen.

Sortenunterschiede sind in den Ergebnissen ebenfalls erkennbar. Diese liegen allerdings eher in der durchschnittlichen Infektionsstärke und weniger in der Reaktion auf die Temperaturunterschiede. In einigen Sorte-Isolat Kombinationen ist eine Tendenz erkennbar, die die zuvor gesehene Steigerung der Infektionsstärke bei steigenden Temperaturen unterstützt. Für die abschließende Bestätigung dieser Befunde wäre allerdings ein weiterer Versuch mit angepasstem Versuchsdesign nötig. Bei höherem Infektionserfolg könnten sich Sortenunterschieden weiter herauskristallisieren.

In der Analyse der Genexpression ist im Gegensatz zu den Infektionsversuchen ein deutliches Ergebnis erkennbar. Während die Genexpression des heat shock Proteins keinen klaren Einfluss der Temperatur zeigte, wurde dieser bei der Genexpression des Pathogenese-bezogenen Proteins PR-1b in der Sorte Kuras deutlich sichtbar. Vier Tage nach der Inokulation wurde das Gen des getestete PR-Proteins vor allem nach der Behandlung mit Isolaten 754_2 und 774_1 unterschiedlich exprimiert. Bei steigenden Temperaturen wurde es vergleichsweise schwächer exprimiert, was eine verminderte Abwehrreaktion der Pflanze andeuten kann. Bei 18 °C war eine stärkere Genexpression messbar, was auf eine bessere Aktivierung der Abwehrmechanismen in der Pflanze hinweist. In der Sorte Marabel war so ein klares Bild nicht erkennbar.

Die temperaturabhängige Expression des PR-Proteins stimmt mit den Ergebnissen aus der Literatur überein (Chen et al., 2003; Janda et al., 2019). Allerdings ist die Abwehrreaktion der Pflanzen von einer Vielzahl von Faktoren abhängig, und in dieser Versuchsreihe wurde lediglich jeweils eines der zahlreichen heat-shock und Pathogenese-bezogenen Protein Gene getestet (Ding et al., 2022). Eine größere Auswahl an getesteten Genen könnte einen Einfluss der Temperatur an anderer Stelle zeigen. Ebenso könnte eine Reaktion der Sorte Marabel auf die Infektion bei unterschiedlichen Temperaturen an anderer Stelle erkennbar werden.

Eine abschließende Aussage über die Sorten-spezifische Sensitivität gegenüber der Temperaturänderung ist an diesem Punkt somit noch nicht möglich. Außerdem lässt sich nicht abschließend beurteilen, ob eine grundsätzlich erhöhte Anfälligkeit der Kartoffeln gegenüber *Alternaria solani* mit steigender Temperatur zu beobachten ist.

6. Fazit

Trotz Schwierigkeiten an verschiedenen Stellen, zeigen über beide Versuchsdurchgänge hinweg die untersuchten Parameter Unterschiede zwischen den Varianten. Der Sortenunterschied wird tendenziell bei den Infektionserfolgen und der Genexpression des Pathogenese-bezogenen Proteins nach vier Tagen sichtbar. Bei der Genexpression erschwert die Kreuzkontamination in der Sorte Marabel im zweiten Versuchsdurchgang eine klare Interpretation.

Der Einfluss der *Alternaria* Isolate scheint in beiden Versuchen besonders von der Sorte x Isolat Interaktion abhängig zu sein. Es ist aber kein klarer Trend erkennbar, inwiefern ein Isolat über alle Wiederholungen, Sorten und Temperaturen hinweg stärker oder schwächer war.

Der zuvor schon beobachtete Einfluss der Temperatur ist im zweiten Durchgang der Versuche in Trends der Symptomentwicklung sichtbar. Besonders sticht allerdings der Effekt auf die Genexpression der Sorte Kuras heraus. Hier scheint es eine negative Korrelation der Genexpression des Pathogenese-bezogenen Proteins mit der erhöhten Temperatur zu geben. Dieses Ergebnis könnte nach einer unabhängigen Bestätigung helfen zu erklären, warum Kartoffeln bei höheren Temperaturen weniger widerstandsfähig gegen *A. solani* Infektionen sind.

7. Ausblick

Die Ergebnisse dieser Studie geben einen Einblick in die Interaktion zwischen *Alternaria solani* und Kartoffel unter verschiedenen Temperaturbedingungen. Die Ergebnisse bieten Ansätze für weiterführende Forschungsprojekte. Dabei sollte auch der Einfluss von deutlich höheren Temperatursteigerungen auf die Infektionsentwicklung untersucht werden. Auch konstant hohe Temperaturen wären als Referenz zu integrieren. Die zur leichteren Interpretation der Daten notwendigen Infektionserfolge könnten vermutlich durch eine sukzessive Erhöhung der *Alternaria*-Sporenkonzentration erzielt werden. Die Anwendung einer qPCR kann neben der visuellen Befallsbonitur die Pilz-DNA-Menge quantifizieren und somit quantitative Informationen zum Befall geben. Aufgrund der Komplexität der pflanzlichen Abwehrmechanismen empfiehlt es sich in weiterführenden Forschungsarbeiten Genexpressionsanalysen an weiteren Heat Shock- und Pathogenese-bezogenen Proteinen durchzuführen oder die gesamte Genexpression global zu erfassen.

8. Abschlussarbeiten und Publikation

Im Rahmen des Projekts wurde eine Bachelorarbeit angefertigt:

Carolin Dürr, TUM, Lehrstuhl für Phytopathologie:

Einfluss verschiedener Temperaturstufen auf die Befallsentwicklung von *Alternaria solani* und die Genexpression an der Kartoffel

Influence of different temperature levels on *Alternaria solani* infection and gene expression in potatoes

Die Ergebnisse werden im Fachmagazin Kartoffelbau, DLG AgroFood Medien GmbH, im Januar 2024 publiziert.

Ferner sind Fachbeiträge (Vortrag, Poster) auf folgenden Fachkonferenzen geplant:

DPG AK Kartoffel, Braunschweig, März 2024

EUROBLIGHT, Workshop Mai 2024, subgroup Early Blight

Referenzen:

Baebler, Š., Stare, K., Kovač, M., Blejec, A., Prezelj, N., Stare, T., et al. (2011). Dynamics of responses in compatible potato-Potato virus Y interaction are modulated by salicylic acid. *PLoS One*, 6(12), e29009.

Chen, Z.J., Ribeiro, A., Silva, M.C. et al. (2003). "Heat shock-induced susceptibility of green coffee leaves and berries to *Colletotrichum gloeosporioides* and its association to PR and hsp70 gene expression". *Physiological and Molecular Plant Pathology*, Volume 63, Issue 4, Pages 181-190, ISSN 0885-5765. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2003.11.004>.

Ding, L.-N., Li, Y.-T., Wu, Y.-Z. et al. (2022). "Plant Disease Resistance-Related Signaling Pathways: Recent Progress and Future Prospects. *International journal of molecular sciences*. 2022, 23, 16200. <https://doi.org/10.3390/ijms232416200>".

Janda, M., Lamparova, L., Zubijova, A. et al. (2019). "Temporary heat stress suppresses PAMP-triggered immunity and resistance to bacteria in *Arabidopsis thaliana*". *Molecular Plant Pathology* 20, 1005–1012.

Makarova, S., Makhotenko, A., Spechenkova, N., Love, A. J., Kalinina, N. O. & Taliansky, M. (2018). Interactive responses of potato (*Solanum tuberosum* L.) plants to heat stress and infection with Potato virus Y. *Frontiers in Microbiology*, 9, 2582.

Nicot, N., Hausman, J. F., Hoffmann, L., & Evers, D. (2005). Housekeeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress. *Journal of experimental botany*, 56(421), 2907-2914.

Shahbazi, H., Aminian, H., Sahebani, N., & Halterman, D. A. (2010). Biochemical evaluation of resistance responses of potato to different isolates of *Alternaria solani*. *Phytopathology*, 100(5), 454-459.

Sołtys-Kalina, D., Szajko, K., Sierocka, I., Śliwka, J., Strzelczyk-Żyta, D., Wasilewicz-Flis, I., et al. (2015). Novel candidate genes AuxRP and Hsp90 influence the chip color of potato tubers. *Molecular Breeding*, 35, 1-12.