



Bundesministerium
für Landwirtschaft, Ernährung
und Heimat



Schlussbericht zum Thema

Etablierung von "Priming" an Tomaten- Jungpflanzen als Pflanzenschutzverfahren im Gartenbau

FKZ: 2819NA061; 2819NA115; 2819NA116; 2819NA123; 2819NA125

Projektnehmer/Projektnehmerin:

Forschungszentrum Jülich GmbH

Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Helmholtz Zentrum München Deutsches Forschungszentrum für Gesundheit und
Umwelt (GmbH)

Hochschule Geisenheim University

Universität Bayreuth

Gefördert durch das Bundesministerium für Landwirtschaft, Ernährung und Heimat auf Grund
eines Beschlusses des deutschen Bundestages im Rahmen des Bundesprogramms Ökologischer
Landbau.

Das Bundesprogramm Ökologischer Landbau (BÖL) hat sich zum Ziel gesetzt, die Rahmenbedingungen für die ökologische Landwirtschaft in Deutschland zu verbessern. Es wird vom Bundesministerium für Landwirtschaft, Ernährung und Heimat (BMLEH) finanziert und in der BÖL-Geschäftsstelle in der Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung (BLE) in die Praxis umgesetzt. Das Programm gliedert sich in zwei ineinandergreifende Aktionsfelder - das Forschungs- und das Informationsmanagement.

Detaillierte Informationen und aktuelle Entwicklungen finden Sie unter:

www.bundesprogramm.de
www.oekolandbau.de/forschung

Wenn Sie weitere Fragen haben, wenden Sie sich bitte an:

Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung
Bundesprogramm Ökologischer Landbau
Deichmanns Aue 29
53179 Bonn
Tel.: 0228-6845-3280
E-Mail: boel-forschung@ble.de

Gefördert durch



Bundesministerium
für Ernährung
und Landwirtschaft



HortiPrimed

aufgrund eines Beschlusses
des Deutschen Bundestages

Schlussbericht Projekt „HortiPrimed“



Autoren: Anika Wiese-Klinkenberg¹, Simone Röhlen-Schmittgen², Sara Beier¹, Tobias Körner², Samaneh Bagheri⁵, Anna Sommer⁵, Sanghyo Moon³, Cory Whitney³, Martin Groth⁴, Corina Vlot-Schuster⁵

Die Förderung des Vorhabens erfolgte aus Mitteln des Bundesministeriums für Ernährung und Landwirtschaft (BMEL) aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages. Die Projektträgerschaft erfolgte über die Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung (BLE) im Rahmen des Bundesprogramm Ökologischer Landbau und andere Formen nachhaltiger Landwirtschaft unter den Förderkennzeichen 2819NA061, 2819NA123, 2819NA115, 2819NA116, 2819NA125.

Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt bei den Autorinnen/Autoren.

Gefördert durch



aufgrund eines Beschlusses
des Deutschen Bundestages



HortiPrimed

Schlussbericht

Vorhabenbezeichnung: „Etablierung von „Priming“ an Tomaten- Jungpflanzen als Pflanzenschutzverfahren im Gartenbau (HortiPrimed)“

Laufzeit des Vorhabens: 01.01.2022 – 31.12.2024

Partner 1
(Koordinatorin)
2819NA061

Dr. Anika Wiese-Klinkenberg
Institut für Bio und Geowissenschaften (IBG-4), Bioinformatik
Forschungszentrum Jülich GmbH
Wilhelm-Johnen-Straße; 52428 Jülich
Tel.: 02461-61-8688 A.Wiese@fz-juelich.de

Partner 2
2819NA123

Dr. Simone Röhlen-Schmittgen / Prof. Jana Zinkernagel
Hochschule Geisenheim University (HGU)
Institut für Gemüsebau
Von-Lade-Str.1; 65366 Geisenheim
Tel.: 06722-502-514 Simone.RoehlenSchmittgen@hs-gm.de

Partner 3
2819NA115

Dr. Cory Whitney / Prof. Eike Lüdeling
Institut für Nutzpflanzenwissenschaften und Ressourcenschutz
(INRES) Universität Bonn
Auf dem Hügel 6; 53121 Bonn
Tel: 0228-73-4643 Cory.Whitney@uni-bonn.de

Partner 4
2819NA116

Dr. Martin Groth
Institut für Funktionale Epigenetik (IFE) Helmholtz Zentrum München
Deutsches Forschungszentrum für Gesundheit und Umwelt (GmbH)
Ingolstädter Landstr. 1; 85764 Oberschleißheim
Tel.: 089-3187-49551 Martin.Groth@helmholtz-muenchen.de

Partner 5
2819NA125

Prof. Dr. A.C. (Corina) Vlot-Schuster
Universität Bayreuth, Fakultät für Lebenswissenschaften:
Lebensmittel, Ernährung und Gesundheit
Professur Genetik der Nutzpflanzen
Fritz-Hornschuch-Str. 13; 95326 Kulmbach
Tel.: 09221-4071200 Corina.Vlot@uni-bayreuth.de

Kurzfassung (in jeweils deutscher und englischer Sprache)

Etablierung von „Priming“ an Tomaten-Jungpflanzen als Pflanzenschutzverfahren im Gartenbau (HortiPrimed)

Anika Wiese-Klinkenberg¹, Simone Röhlen-Schmittgen², Sara Beier¹, Tobias Körner², Samaneh Bagheri⁵, Anna Sommer⁵, Sanghyo Moon³, Cory Whitney³, Martin Groth⁴, Corina Vlot-Schuster⁵

1: A.Wiese@fz-juelich.de Institut für Bio und Geowissenschaften (IBG-4), Bioinformatik, Forschungszentrum Jülich GmbH, Wilhelm-Johnen-Straße; 52428 Jülich

2: Simone.RoehlenSchmittgen@hs-gm.de, Institut für Gemüsebau Hochschule Geisenheim University (HGU), Von-Lade-Str.165366 Geisenheim

3: Cory.Whitney@uni-bonn.de Institut für Nutzpflanzenwissenschaften und Ressourcenschutz (INRES), Universität Bonn, Auf dem Hügel 6; 53121 Bonn

4: Martin.Groth@helmholtz-muenchen.de Institut für Funktionale Epigenetik (IFE), Helmholtz Zentrum München Deutsches Forschungszentrum für Gesundheit und Umwelt (GmbH), Ingolstädter Landstr. 1; 85764 Oberschleißheim

5: Corina.Vlot@uni-bayreuth.de Fakultät für Lebenswissenschaften: Lebensmittel, Ernährung und Gesundheit, Professur Genetik der Nutzpflanzen, Universität Bayreuth, Fritz-Hornschuch-Str. 13; 95326 Kulmbach

Stress-Vorbehandlungen können zu einer verbesserten Stresstoleranz in Pflanzen führen („Priming“). **HortiPrimed** hatte die Zielsetzung, Priming durch abiotischen Stress als eine nicht-chemische Schutzmaßnahme für Tomatenpflanzen zu entwickeln. Im Projekt wurden Salzstress bei Jungpflanzen und Hitzestress bei Keimlingen als Maßnahmen zur Stärkung gegen biotischen oder abiotischen Stress etabliert. Nach einem Salzstress-Priming konnte verbessertes Wachstum unter Salzstressbedingungen und auch eine Toleranz gegen *Alternaria alternata* erreicht werden. Molekularbiologische Untersuchungen zeigten klare Veränderungen der Genaktivitäten, die mit der gesteigerten Toleranz/Resistenz einhergingen, und Kandidatengene für die Züchtung von Stressresistenzen anzeigten. Zudem konnten epigenetische Veränderungen an Genen identifiziert werden, die eine anhaltende Stresserinnerung in den geprimten Jungpflanzen ermöglichen. Langanhaltende Effekte der Primingbehandlungen bis in die Tomatenproduktion waren dennoch nur sehr schwach und ohne direkte Auswirkung auf Erträge oder Qualität der Früchte. Dabei zeigte sich eine kurzzeitige Stimulation von phenolischen Inhaltsstoffen, wie sie auch in der Salzstresstoleranz in jungen Pflanzen beobachtet wurde. Die Modellierung der Wirkung einer Investition in Priming auf Ertrag und Gewinne in der Tomatenproduktion zeigten nur einen geringen positiven Beitrag des Hitze-Primings bei Hitzestress. Erlangte Ergebnisse und Erfahrungen von Tomatenproduzenten wurden in einer Modellierungs-Software zur Vorhersage von Gewinnen in der Tomatenproduktion zusammengefasst, die Nutzern online zur Verfügung steht. Mit der umfangreichen Untersuchung des Primings in Tomate hat HortiPrimed dazu beigetragen, dessen Einsatzmöglichkeiten als biologischen Pflanzenschutz auf Ebene der Immunisierung und Stärkung von Pflanzen durch abiotische Stress-Vorbehandlungen weiterzuentwickeln und die damit verbundenen Hürden darzustellen. Für den praktischen Einsatz im Tomatenanbau sind weiterführende Forschungsarbeiten erforderlich, um die Anwendung und Umsetzung zu sichern.

Establishment of “priming” on young tomato plants as a plant protection method in horticulture (HortiPrimed)

Anika Wiese-Klinkenberg¹, Simone Röhlen-Schmittgen², Sara Beier¹, Tobias Körner², Samaneh Bagheri⁵, Anna Sommer⁵, Sanghyo Moon³, Cory Whitney³, Martin Groth⁴, Corina Vlot-Schuster⁵

1: A.Wiese@fz-juelich.de Institute for Bio and Geosciences (IBG-4), Bioinformatics, Forschungszentrum Jülich GmbH Wilhelm-Johnen-Straße; 52428 Jülich, Germany

2: Simone.RoehlenSchmittgen@hs-gm.de, Department of Vegetable Crops, Hochschule Geisenheim University (HGU) Von-Lade-Str.1; 65366 Geisenheim, Germany

3: Cory.Whitney@uni-bonn.de Institute of Crop Science and Resource Conservation (INRES) University of Bonn, Auf dem Hügel 6; 53121 Bonn, Germany

4: Martin.Groth@helmholtz-muenchen.de Functional Epigenetics (IFE), Helmholtz Munich Ingolstädter Landstr. 1; 85764 Oberschleißheim, Germany

5: Corina.Vlot@uni-bayreuth.de Faculty of Life Sciences: Food, Nutrition and Health, Chair of Crop Plant Genetics, University of Bayreuth, Fritz-Hornschuch-Str. 13; 95326 Kulmbach

Stress pretreatments can lead to improved stress tolerance in plants (“priming”). **HortiPrimed** aimed to develop priming through abiotic stress as a non-chemical protective measure for tomato plants. The project established salt stress in young plants and heat stress in seedlings as measures to strengthen resistance to biotic or abiotic stress. After salt stress priming, improved growth under salt stress conditions and tolerance to *Alternaria alternata* were achieved. Molecular biological studies showed clear changes in gene activities associated with increased tolerance/resistance and enabled the identification of candidate genes for further breeding of stress resistance. In addition, epigenetic changes in genes were identified that enable persistent stress memory in the primed young plants. However, long-lasting effects of salt or heat stress priming extending into tomato production were only very weak and had no direct impact on fruit yield or quality. Nevertheless, a short-term stimulation of phenolic compounds was observed, as was also seen in salt stress tolerance in young plants. Modeling the effect of an investment in priming on yield and profits in tomato production showed only a small positive contribution of heat priming under heat stress. The results obtained and the experience gained from tomato producers were summarized in a modeling software for predicting profits in tomato production, which is now available to users online. With its comprehensive investigation of priming in tomatoes, HortiPrimed has contributed to further developing its potential as a biological plant protection measure at the level of immunization and strengthening of plants through abiotic stress pretreatments and to identifying the associated hurdles. For practical application in tomato cultivation, further research is required to ensure successful implementation and applicability.

Gliederung des Schlussberichtes

1. Einführung.....	6
1.1 Gegenstand des Vorhabens	6
1.2 Ziele und Aufgabenstellung des Projekts, Bezug des Vorhabens zu den einschlägigen Zielen des BÖL oder zu konkreten Bekanntmachungen und Ausschreibungen	6
1.3 Planung und Ablauf des Projektes	8
2. Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde.....	11
3. Material und Methoden	14
3.1. Material und Methoden in Arbeitspaket 1 Priming von Tomaten-Jungpflanzen gegen abiotischen Stress (Forschungszentrum Jülich, IBG-4, 2819NA061)	14
3.2. Material und Methoden in Arbeitspaket 2: Priming gegen biotischen Stress/Schadorganismen (Universität Bayreuth, Partner 5, 2819NA125).....	22
3.3. Material und Methoden in Arbeitspaket 3: Priming und Priming-Effekte während der Fruchtproduktion (Hochschule Geisenheim, 2819NA123)	27
3.4. Material und Methoden in Arbeitspaket 3: Priming und Priming-Effekte während der Fruchtproduktion (Universität Bonn, 2819NA115).....	41
3.5. Material und Methoden in Arbeitspaket 4: Molekulare Bestimmung des Primings (Helmholtz Zentrum München, IFE, 2819NA116)	44
4. Ausführliche Darstellung der wichtigsten Ergebnisse	53
4.1. Ergebnisse zu Arbeitspaket 1: Priming von Tomaten-Jungpflanzen gegen abiotischen Stress (Forschungszentrum Jülich, IBG-4, 2819NA061).....	53
4.2. Ergebnisse zu Arbeitspaket 2: Priming gegen biotischen Stress/Schadorganismen (Universität Bayreuth, Partner 5, 2819NA125)	71
4.3. Ergebnisse zu Arbeitspaket 3: Priming und Priming-Effekte während der Fruchtproduktion (Hochschule Geisenheim, 2819NA123)	81
4.4. Ergebnisse zu Arbeitspaket 3: Priming und Priming-Effekte während der Fruchtproduktion (Universität Bonn, 2819NA115).....	96
4.5. Ergebnisse zu Arbeitspaket 4: Molekulare Bestimmung des Primings (Helmholtz Zentrum München, IFE, 2819NA116)	100
5. Diskussion der Ergebnisse	105
Diskussion zu Arbeitspaket 1: Priming von Tomaten-Jungpflanzen gegen abiotischen Stress	105
Diskussion zu Arbeitspaket 2: Priming gegen biotischen Stress/Schadorganismen.....	110
Diskussion zu Arbeitspaket 3: Priming und Priming-Effekte während der Fruchtproduktion (Hochschule Geisenheim).....	111
Diskussion zu Arbeitspaket 3: Priming und Priming-Effekte während der Fruchtproduktion (Uni Bonn)	114
Diskussion zu Arbeitspaket 4: Molekulare Bestimmung des Primings.....	115
6. Angaben zum voraussichtlichen Nutzen und zur Verwertbarkeit der Ergebnisse	117

7. Gegenüberstellung der ursprünglich geplanten zu den tatsächlich erreichten Zielen; Hinweise auf weiterführende Fragestellungen	119
8. Zusammenfassung	124
9. Literaturverzeichnis	126
10. Übersicht über alle im Berichtszeitraum vom Projektnehmer realisierten Veröffentlichungen zum Projekt (Printmedien, Newsletter usw.), bisherige und geplante Aktivitäten zur Verbreitung der Ergebnisse	137
10.1. Publikationen in peer-reviewten Journalen	137
Geplante Publikationen in peer-reviewten Journalen	137
10.2. Publikationen in nicht peer-reviewten Journalen.....	137
10.3. Konferenzen, Posterbeiträge, Vorträge	138
10.4. Abschlussarbeiten	140
10.5. Material für die Öffentlichkeitsarbeit	141
Anhang zum öffentlichen Bericht	142

1. Einführung

1.1 Gegenstand des Vorhabens

Zunehmend sind Nutzpflanzen in Landwirtschaft und Gartenbau abiotischen und biotischen Stressen ausgesetzt, die den Einsatz von Pflanzenstärkungs- oder Pflanzenschutzmitteln erfordern. Der Einsatz chemischer Pflanzenschutzmittel sollte aufgrund der schädigenden Wirkung für Mensch und Umwelt reduziert werden (Nicolopoulou-Stamati et al. 2016; Storck et al. 2017; BMEL 2013). Ebenso fordert die Gesellschaft einen ressourcenschonenden und nachhaltigen Anbau ohne Einsatz von Pestiziden (Ludwig-Ohm et al. 2017). Eine kontrollierte Stressvorbehandlung (Primingstimulus) von Saatgut oder Jungpflanzen kann eine **gesteigerte Stressresistenz** und verbesserte Reaktion der Pflanzen bei späterem Folge-Stress erzeugen. Diesen Effekt der Vorbereitung auf nachfolgende Stresse nennt man „**Priming**“ (Hilker et al. 2016; Beckers and Conrath 2007), definiert als sowohl beschleunigte als auch stärkere Schutzreaktion bei wiederkehrendem Stress. Dabei können Pflanzen auch gegen zusätzliche Stressarten stabilisiert werden (Li et al. 2015; Martinez-Ferri et al. 2019). Aufbauend auf diesem natürlichen Schutzmechanismus soll im Projekt HortiPrimed ein „Primingverfahren“ für die Tomatenproduktion etabliert werden. Der Tomatenanbau soll so mit vorbehandelten Pflanzen **gegen Schädlinge stabilisiert** und an die **Herausforderungen des Klimawandels mit häufiger auftretendem abiotischem Stress** angepasst werden, da **Wetter- bzw. Temperaturextreme**, auch im kontrollierten Anbau Auswirkungen zeigen (Gruda et al. 2019; Bisbis et al. 2018).

1.2 Ziele und Aufgabenstellung des Projekts, Bezug des Vorhabens zu den einschlägigen Zielen des BÖL oder zu konkreten Bekanntmachungen und Ausschreibungen

Im Projekt HortiPrimed sollte „Priming“ als alternative Pflanzenschutzmaßnahme zur nachhaltigen Pflanzenproduktion getestet und etabliert werden. Dabei sollten spezifische Protokolle zur abiotischen Stressvorbehandlung in der Tomaten-Jungpflanzenproduktion entwickelt und etabliert werden, die als vorgelagerten Bestandteil des geschützten Produktionsgemüsebaus eine zentrale Rolle spielt. Auch eine Stressbehandlung im Produktionsgewächshaus sowie die Kombination von mehreren Stressphasen sollten auf ihre schützende Wirkung untersucht werden. Dem Modul B (BMEL-Bundesprogramm Ökologischer Landbau und andere Formen nachhaltiger Landwirtschaft) zugeordnet, stellte eine im Projektrahmen geplante Etablierung einer Jungpflanzen-Abhärtung eine neue Strategie des nicht-chemischen Pflanzenschutzes dar, die im ökologischen Gartenbau und in anderen Formen nachhaltiger Landbewirtschaftung eingesetzt werden kann. Im Kontext des Programms zur Innovationsförderung des Bundesministeriums für Ernährung und Landwirtschaft (BMEL) setzte HortiPrimed bei den Zielen für leistungsfähige Kulturpflanzen und produktive, nachhaltige und an die jeweilige Region angepasste Anbauverfahren zur Sicherung der Welternährung (Pflanzenzüchtung und Pflanzenschutz) an.

Das Projekt HortiPrimed untersuchte „Priming“ im Gartenbau zur Tomatenproduktion als eine einfache, kostengünstige Methode zur Stabilisierung oder Immunisierung von Pflanzen (Punkt C der Förderbekanntmachung) gegen abiotische und biotische Stressfaktoren, die so keine künstlichen Stärkungsprodukte benötigen und somit auch die Nutzung von Pflanzenschutzmitteln verringern würden. Folglich entspricht das Projektvorhaben den Richtlinien des Nationalen Aktionsplans zur nachhaltigen Anwendung von Pflanzenschutzmitteln

(„NAP“, BMEL, 2013), um Pflanzenschutzmittelrückstände in Umwelt und in Lebensmitteln nachhaltig zu reduzieren. Anwendungsrisiken von Pflanzenschutzmitteln werden reduziert und gleichzeitig könnte mit dem angestrebten Verfahren der Umwelt- und Insektenschutz sowie die biologische Vielfalt gefördert werden (Geiger et al. 2010; Sharma et al. 2019).

In HortiPrimed wurden etablierte Phänotypisierungstechniken zur nicht-invasiven Quantifizierung der Reaktion von Tomatenpflanzen auf abiotischen und biotischen Stress genutzt, um Intensität und Wirkung des Primingstresses zu kontrollieren und zu dosieren, sowie um die Stresstoleranzen von behandelten (gestärkten) Pflanzen und unbehandelten Pflanzen zu vergleichen. Mit diesen Phänotypisierungstechniken erarbeitet HortiPrimed zusätzlich zu den Priming-Methoden Techniken zum praxistauglichen Monitoring, wie in Punkt A der Förderbekanntmachung (Bundesanzeiger 2019) von abiotischem/biotischem Stress bei Tomaten. Im Projekt HortiPrimed wurde die molekulare Ausprägung des Primings mit etablierten Techniken auf Ebene der Epigenetik und Genregulation untersucht, um das durch kontrollierte Stressvorbehandlungen erzielte „Priming“ auf molekularer Ebene nachzuweisen, zu quantifizieren und Priming-Gene zu identifizieren. So sollten die Effektivität der verschiedenen Stressvorbehandlungen als Primingstimulus an den Jungpflanzen überprüft (Diagnose/Qualitätskontrolle) und Vorhersagen über die Stärkung der Pflanzen in der späteren Produktion getroffen werden (Früherkennung/Prognosesystem). Außerdem sollten diese Untersuchungen zur Aufklärung der molekularen Mechanismen des Phänomens „Priming“ beitragen. Die Identifizierung von Priming-Genen und epigenetischen Markern stellt die Grundlage für eine Züchtung von resistenten Linien in möglichen Folgeprojekten gemäß der HortInnova-Forschungsstrategie (Ludwig-Ohm et al. 2017) dar. Die Züchtung klimaresilienter Sorten soll laut der Biostrategie 2030 (BMEL 2024) durch „Untersuchung des Einflusses der Produktionsumwelt auf das Individuum, auch auf epigenetischer Ebene“ vorangebracht werden (Maßnahme 1: Pflanzenzüchtung und Tierzucht für den ökologischen Landbau fördern). Auch die im Projekt etablierte Technik für eine Simulation von Hitze und UV-Stress im Gewächshaus kann zukünftige Forschungsansätze für die Züchtung unterstützen. HortiPrimed integrierte eine Untersuchung der molekularen Mechanismen des Primings bis zur Ausprägung von Stresstoleranzen in vegetativen und generativen Stadien. Priming sollte so als prophylaktische Pflanzenschutzmaßnahme (HortInnova, Ludwig-Ohm et al., 2017) an Tomate nachvollziehbar und reproduzierbar etabliert werden und könnte folglich in der Praxis von Jungpflanzenproduzenten oder Gartenbaubetrieben angewandt werden. Die erlangten Erkenntnisse zum Priming und seinen Mechanismen können in Zukunft auch auf weitere Gartenbaukulturen übertragen werden und weiter ausgebaut werden.

Ein mit Erfahrungen und Ergebnissen des Projektes unterstütztes Vorhersagemodell soll abschließend als Entscheidungshilfe bei der Wahl effektiver Priming-Behandlungen und für damit verbundene ökonomische (z.B. Ertragserwartungen, Einkommen auf Betriebsebene) und ökologische (z.B. Wasserverschmutzung) Aspekte in der gartenbaulichen Produktion eingesetzt werden.

Eine wie im Projekt untersuchte Pflanzenbehandlung zur Abhärtung gegen nachfolgende Stressbedingungen bietet ein großes Innovationspotential, um sowohl im traditionellen als auch im ökologischen Gartenbau sowie in nachhaltigen Anbausystemen eine maßgebliche Praxisanwendung zu finden. Das Projekt zielte somit auf eine Etablierung eines umweltschonenden, fortschrittlichen und zukunftssträchtigen Pflanzenschutzverfahrens ab, das durch den Wissenstransfer in und über involvierte Betriebe die Wettbewerbsfähigkeit des deutschen Gartenbausektors zukünftig stärken kann.

1.3 Planung und Ablauf des Projektes

HortiPrimed kombinierte Expertise in der nicht-invasiven Phänotypisierung und der kontrollierten Stressapplikation (IBG-4 - Forschungszentrum Jülich) mit Expertise in der Molekularbiologie zur Entschlüsselung der zu Grunde liegenden molekularen Mechanismen (Universität Bayreuth und IFE - Helmholtz Zentrum München / IBG-4). Die Wirkungen der Vorbehandlungen auf Stress-toleranzen und Erträge unter produktionsnahen Bedingungen wurden von Gartenbauwissenschaftler*innen (Institut für Gemüsebau – Hochschule Geisenheim University) untersucht. Die Erzeugung von biotischen Resistenzen durch Priming wurde von Phytopatholog*innen (Universität Bayreuth) untersucht. Das Projekt wurde beratend unterstützt von einem **Praxisbeirat** mit einer Jungpflanzen-Produktionsfirma (Gipmans), zwei Gartenbaubetrieben (Vitarom und Gartenbau Hoffmann), der Landwirtschaftskammer NRW (LWK NRW) in Straelen, dem Landesbetrieb Landwirtschaft Hessen (LLH) in Geisenheim und dem Kompetenzzentrum Gartenbau (KoGa), der die reale Durchführbarkeit des Verfahrens bewerten konnten und an Projekttreffen teilnahm.

Arbeitsplan

Interaktionen zwischen den Partnern und Arbeitspaketen (APs) sind in Abbildung 1.1 dargestellt, Tabelle 1.1 zeigt die geplanten Arbeitspakete.

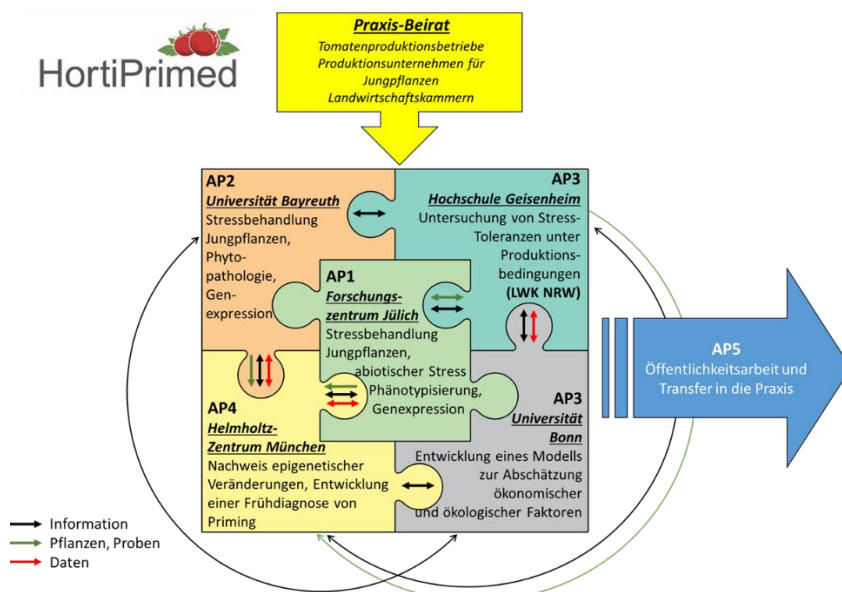


Abbildung 1.1: Projektzusammenarbeit

Alle Partner haben in den Arbeitspaketen intensiv über Probenweitergabe und Datenaustausch miteinander interagiert (Abb. 1.1), es fanden regelmäßige Projekttreffen statt (online und in Person). AP1 und AP2 haben in Absprache miteinander in Jungpflanzen gleich angelegten Salzstress als Primingstimuli angewendet und in Folge nach kürzeren Erholungs-Abständen eine nachfolgende Verbesserung von Toleranzen zu abiotischen (AP1) und biotischen (AP2) Folgestressen untersucht.

In AP3 wurden entsprechend Auswirkungen von vergleichbaren Priming-induzierenden Stressen in Pflanzen unter produktionsnahen Bedingungen untersucht. Dabei wurde auch die Auswirkung auf den Fruchtertrag und die Fruchtqualität untersucht. An der Universität Bonn (Partner 3) wurden die Daten und Kenntnisse aus AP3, die durch Phänotypisierung und physiologische

Untersuchungen gewonnen wurden, zur Erstellung eines Vorhersagemodelles zum Priming genutzt. Informationen und Daten aus AP1, 2 und 4 sollten in die Entwicklung des Modelles in AP3 einfließen. Die entwickelten Techniken zu Applikation von Hitze und UV-Stresssimulation konnten helfen, eine Stresstoleranz der Pflanzen im Gewächshaus in praxisrelevanten Stressszenarien (AP3) zu untersuchen.

Die Ausprägung des Salz-Primings wurde in AP4 auf molekularer Ebene untersucht, da besonders epigenetische Veränderungen charakteristisch und aussagekräftig sind und eine langanhaltende Stresstoleranz bewirken können. Hierzu wurden Jungpflanzenproben von AP1 und AP2 zur Verfügung gestellt. In AP1 und AP2 wurden zudem Genexpressionsstudien durchgeführt, die zusätzlich das Verständnis über die Auswirkung der epigenetischen Veränderungen erweitern sollten. Im dritten Jahr wurden anknüpfend die molekularbiologischen Kenntnisse zu Genexpression und epigenetischer Regulation für den molekularen Nachweis des Primings (AP4) weiterentwickelt und sollten unter Produktionsbedingungen überprüft werden.

Phänotypisierungstechniken zur Quantifizierung der Stressantworten wurden in den Arbeitspaketen 1, 2 und 3 genutzt und verglichen. Im Arbeitspaket 5 wurden durch alle Partner mit Unterstützung des Praxisbeirates die Projektziele und erlangte Ergebnisse über einen Flyer, Social media, einen Disseminationsfilm, Publikationen und Vorträge auf Konferenzen der Öffentlichkeit zur Verfügung gestellt.

Tabelle 1.1 Arbeitspakete des Projektes HortiPrimed

Arbeitspaket 1 Priming von Tomaten-Jungpflanzen gegen abiotischen Stress (Forschungszentrum Jülich, IBG-4)
AP1.1 Etablierung von Primingstimuli an Jungpflanzen
AP1.2 Etablierung RT qPCR und RNA-Extraktion
AP1.3 Quantifizierung der Stressantwort, Analyse der Expression von Markergenen, Gesamtphenole
AP1.4 Priming von Jungpflanzen für Gewächshausstudien
AP1.5 RNA-Seq Genexpressionsstudie
AP1.6 Untersuchung von Toleranzen gegen weitere abiotische Stresse
AP1.7 Korrelation von Phänotypisierungsdaten mit epigenetischen Veränderungen
Arbeitspaket 2: Priming gegen biotischen Stress/Schadorganismen (Universität Bayreuth)
AP2.1 Etablierung von Stress-Priming-Verfahren an Jungpflanzen
AP2.2 Stressbehandlungen und folgende Untersuchung von erzeugten Resistenzen
AP2.3 Korrelation von Genexpression mit epigenetischen Veränderungen
AP2.4 Langzeitbeobachtung von geprimten und infizierten Pflanzen (Phänotypisierung)
Arbeitspaket 3: Priming und Priming-Effekte während der Fruchtproduktion (Hochschule Geisenheim und Universität Bonn)
AP3.1 Etablierung des technischen Aufbaus (Hitze/UV-Beleuchtung) im Gewächshaus
AP3.2 Etablierung und Optimierung der Stressbedingungen an Jungpflanzen
AP3.3 Entwicklung eines Messprotokolls für den Sensoreinsatz auf Blatt-/Fruchtebene
AP3.4 Etablierung des Stressprotokolls (Hitze, UV) und Quantifizierung der Auswirkungen auf Ertrag und Qualitätsparameter geprimter Pflanzen
AP3.5 Entwicklung des holistischen kausalen Modells zur Abschätzung kausaler Zusammenhänge ertragsrelevanter Faktoren
AP3.6 Validierung experimenteller Ergebnisse und Demonstrationsversuch (HGU, LWK NRW)
Arbeitspaket 4: Molekulare Bestimmung des Primings (Helmholtz Zentrum München, IFE)
AP4.1 Etablierung von Salz-Priming-Verfahren an Jungpflanzen
AP4.2 Etablierung der Epigenomik in Tomate/ Genomischen Untersuchungen zur Bestimmung epigenetischer Veränderungen durch Salz-Priming
AP4.3 Genexpressionsanalyse von Blattproben nach Salz-Priming (vor und nach Infektion)
AP4.4 Genomischen Untersuchungen zur Bestimmung epigenetischer Veränderungen durch abiotisches Stress-Priming
AP4.5 Übertragung auf Produktionslinie/Untersuchung epigenetischer Unterschiede an Markergenen in geprimten/kontrollbehandelten Jungpflanzen
AP4.6 Vergleichende bioinformatische Auswertung von epigenomischen, Genexpressions- und Phänotypisierungsdaten
AP4.7 Etablierung und Validierung eines <i>in vitro</i> Tests für abiotisches Priming in Tomaten
Arbeitspaket 5 Technologie- und Wissenstransfer in die Praxis
AP5.1 Erstellung von Projektflyern
AP5.2 Veröffentlichungen von Projektkonzept und Ergebnissen in Fachzeitschriften und auf Konferenzen
AP5.3 Erstellung und Veröffentlichung eines Projekt-Videos
AP5.4 Erstellung und Verbreitung von Praxis-Merkblättern

2. Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde

Abiotischer und biotischer Stress beeinflusst die Erträge in Landwirtschaft und Gartenbau (Boyer 1982; Francini and Sebastiani 2019). Maßgeblich beteiligt ist dabei die fortschreitende atmosphärische Erwärmung (IPPC 2018). Veränderungen im Klima zeigen Einfluss auf die Gemüseproduktion, auch im geschützten Anbau (Bisbis et al. 2018). Durch Hitze steigt z.B. die Menge schadhafter Früchte durch Blütenendfäule und Fruchtgröße sowie Ertrag sinken (Sato et al. 2000; Gruda and Tanny 2014; Rosales et al. 2011). Die veränderten Klimaverhältnisse verstärken außerdem den Befall mit Pathogenen (Hance et al. 2007). Dabei werden der Einsatz von Pflanzenschutz- oder Pflanzenstärkungsmitteln sowie eine energetisch aufwändige Temperaturkontrolle nötig (Bisbis et al. 2018). Ein Weg, die Auswirkungen solcher Stresse zu verringern, ist die Züchtung und der Einsatz verbesserter Varietäten, die gegen Pflanzenkrankheiten resistent sind (Adhikari et al. 2017; Wang et al. 2018) oder bestimmte abiotische Stresse besser tolerieren (Foolad 2007). Herkömmliche Züchtungsverfahren sind langwierig (Ceccarelli and Grando 2006) und negative Wechselwirkungen zwischen Schädlingsresistenzen und Erträgen sind abzuwägen (Brown and Rant 2013). Auch das Einbringen von Transgenen (Gerszberg and Hnatuszko-Konka 2017; Krishna et al. 2019); oder genetische Veränderungen wie z.B. durch die CRISPR/Cas9 Technologie (Ortigosa et al. 2019) finden in Europa aktuell keine Akzeptanz (Kok et al. 2019).

Ein alternativer Lösungsansatz ist eine Verbesserung der Stressantwort von Pflanzen durch sogenanntes „Priming“: die Fähigkeit von Pflanzen nach Erfahrung eines Stresses bei erneut auftretenden Stressen entsprechende Schutzmechanismen schneller und stärker zu aktivieren (Conrath et al. 2015). Dabei kann Priming auch ergänzend, zusätzlich verstärkend zu anderen Maßnahmen z. B. in Kultivierung oder in Kombination mit züchterisch verbesserten Sorten/Linien angewandt werden. Priming kann auf verschiedenen Wegen ausgelöst werden, wie durch Herbivorie (Ali et al. 2013) oder lokale Pathogeninfektionen, die zu systemischen Resistenzen (SAR, systemic acquired resistance) in der ganzen Pflanze führen (Vlot et al. 2021). Beruhend auf der Induktion der SAR durch eine Anreicherung von endogener Salizylsäure (SA), kann Priming auch durch eine Behandlung mit SA, dessen funktionellem Analog Benzothiadiazol (BTH) und anderen Chemikalien stimuliert werden (Vlot et al. 2009). In Tomate erzeugt eine BTH-Behandlung eine Resistenz gegen Pathogene (Benhamou and Bélanger 1998; Azami-Sardooei et al. 2013) und Melatonin-Vorbehandlungen schützten Tomate gegen Hitzestress (Jahan et al. 2019). Einige effektive Substanzen zur Induktion von Priming gelten allerdings als toxisch, gesundheits- und umweltschädlich oder auch als phytotoxisch (Bruhl et al. 2013; van Hulten et al. 2006; Syngenta 2018). Neben Pflanzenschädlingen oder chemischen Substanzen können auch abiotische Stressarten wie Hitze, osmotischer Stress, Kälte, oder Trockenstress Priming induzieren. Eine signifikant verbesserte Toleranz gegen Salz-, Hitze- und Trockenstress ist mehrfach in *Arabidopsis thaliana* beobachtet worden, nachdem ein Priming mit jeweils gleichen Stressfaktoren induziert wurde (Lämke and Bäurle 2017). Wie in *Arabidopsis thaliana* (Ling et al. 2018) wurde auch ein „Thermopriming“ für Tomatenkeimlinge nachgewiesen, bei dem eine Vorbehandlung mit Hitzestress zu einer gesteigerten Hitzetoleranz führte (Serrano et al. 2019; Zhou et al. 2020).

Zusätzlich zu den oben genannten Beispielen, bei denen Eingangs- und Folgestress gleichartig sind, kann Priming auch zu „Kreuz-Toleranzen“ gegen unterschiedliche Stressfaktoren führen

(Thomas et al. 2019). Beispiele für solche Kreuz-Toleranzen nach Priming gibt es in *A. thaliana*, welche nach Salz-, Hitze- oder Kältevorbehandlungen, sowie UV-Bestrahlung eine erhöhte Resistenz gegen pathogene Bakterien oder Pilze zeigten (Singh et al. 2014; Xu et al. 2019). Ein Trockenstress-Priming im vegetativen Stadium in Sommerweizen induzierte im generativen Stadium nicht nur eine Toleranz gegen Trockenstress sondern auch gegen Hitze (Wang et al. 2014).

Typischerweise verändert sich beim Priming die Expression von Abwehrgenen nach der das Priming auslösenden Behandlung, dem „Primingstimulus“, oft nur minimal (Martinez-Medina et al. 2016; Verhagen et al. 2004). Stattdessen kommt es bei Folgestress, wie einer Infektion, zu einer beschleunigten und verstärkten Aktivierung von Abwehrgenen (Conrath 2011). Dadurch ist die Pflanze in der Lage, z.B. Krankheitserreger schneller und erfolgreicher zu bekämpfen, und somit ihre Resistenz zu steigern. Ein entscheidender Vorteil des Primings gegenüber einer (konstitutiv) induzierten Resistenz ist, dass bei vergleichbarer Stresstoleranz signifikant weniger Ressourcen der Pflanze in Anspruch genommen werden (van Hulten et al. 2006). Dies schützt die Pflanze nachweislich vor Einbußen bei Wachstum und Ertrag. So konnte für BTH-induziertes Priming der Pathogenabwehr in *A. thaliana* und Tomate kein Einfluss auf Wachstum (Azami-Sardooei et al. 2013; van Hulten et al. 2006) sowie bei *Arabidopsis* auch nicht auf die Ertragsfähigkeit festgestellt werden (van Hulten et al. 2006). Höhere BTH-Konzentrationen dagegen, die eine konstitutiv induzierte Resistenz zur Folge hatten, führten in einigen Pflanzenarten zu erheblichen Wachstums- (Azami-Sardooei et al. 2013) und Saatguteinbußen (van Hulten et al. 2006). Im Feld konnte unter natürlichem Infektionsdruck nach Priming durch SA, ein deutlich höherer Ertrag bei *A. thaliana*-Pflanzen beobachtet werden (Traw et al. 2007). Ein stabilisierter Ertrag ist durch Priming auch bei Nutzpflanzen zu erwarten (Huot et al. 2014). Nach aktuellem Wissenstand ist anzunehmen, dass ein nachhaltiger Primingeffect von der Art und Intensität des Primingstimulus abhängt (Mauch-Mani et al. 2017; Westman et al. 2019; Wibowo et al. 2016). Die Nachhaltigkeit des Primings, d. h. der Zeitraum zwischen Primingstimulus und dem Belastungszeitpunkt, bei dem noch eine verstärkte Antwort auftritt, setzt eine Stresserinnerung voraus, wobei zwischen somatischer und generationsübergreifender Stresserinnerung unterschieden wird. Die somatische Stresserinnerung, ausgelöst durch abiotische Stimuli (Trockenheit, Salz, Hitze, und Kälte), wie auch die induzierte systemische Pathogenresistenz in Folge von biotischen Stresssignalen, sind transient und wurden in *A. thaliana* oft 3 bis 10 Tage nach dem Primingstimulus beschrieben, können sich jedoch auch von der vegetativen bis zur reproduktiven Phase erstrecken (Lämke and Bäurle 2017). So konnte gezeigt werden, dass bei Weizen ein frühes, mildes Trockenstress-Priming im vegetativen Stadium zu einer Toleranz gegen Trockenheit im generativen, fruchtproduzierenden Stadium führte (Wang et al. 2014). Hitzebehandlung (Thermoprimering) von Weizenkeimlingen konnte eine verbesserte Toleranz gegen Hitze in der Blühphase erzeugen (Fan et al. 2018), und auch in Reis führte ein Salzschock in der vegetativen Phase der Pflanzen zu einer besseren Toleranz in der generativen Phase (do Amaral et al. 2020). Demnach kann Stresserfahrung im Jungpflanzenstadium zu gesteigerter Toleranz in späteren Entwicklungsstadien führen. Bei der generationsübergreifend erworbenen Resistenz (transgenerational acquired resistance) wird eine induzierte Resistenz in der Elterngeneration auf die Nachkommen übertragen. Sie wird meist in Folge extremer und/oder sich über mehrere Generationen wiederholender Stresse beobachtet (Luna et al. 2012; Wibowo et al. 2016; Rasmann et al. 2012; Slaughter et al. 2012).

Eine langanhaltende somatische Stresserinnerung, sowie die generationsübergreifende erworbene Resistenz werden zumeist auf epigenetische Mechanismen zurückgeführt, da diese

eine Weitergabe von stressinduzierten zellulären Veränderungen während der Zellteilung ermöglichen. Dies erfolgt definitionsgemäß ohne Veränderungen der DNA-Sequenz (Berger et al. 2009). Stattdessen übernehmen dabei chemische Veränderungen am Chromatin (dem makromolekularen Komplex aus DNA und großteils Histonproteinen, welcher die Chromosomen bildet) in Form von DNA-Methylierung und Histonmodifikationen eine zentrale Rolle. Diese beeinflussen die Aktivität von Genen und werden während der Zellteilung aufrechterhalten, so dass es zu nachhaltigen Veränderungen der Zelleigenschaften kommt (Iwasaki and Paszkowski 2014; Lämke and Bäurle 2017). Zahlreiche Studien an verschiedenen Pflanzenarten belegen mittlerweile, dass abiotischer und biotischer Stress, sowie metabolische Veränderungen zu lokalen und genomweiten Veränderungen der DNA-Methylierungsmuster führen können (Dowen et al. 2012; Groth et al. 2016; Lindermayr et al. 2020; Wibowo et al. 2016; Yung et al. 2024). Die Bedeutung der DNA-Methylierung in der anhaltenden Stresserinnerung wurde durch eingehende genetische und genomische Untersuchungen in *A. thaliana* bekräftigt, die eine Korrelation von Stressbehandlung, DNA-Methylierungsmustern und Stressresistenz in sukzessiven Generationen zeigten (Stassen et al. 2018; Wibowo et al. 2016). Histonmodifikationen, insbesondere die Di-/Tri-Methylierung von Histon H3 Lysin 4 (H3K4me2/me3), spielen beim Priming eine wichtige Rolle, indem sie „Memory-Gene“ markieren, die anhaltend aktiviert oder auf eine verstärkte Antwort bei wiederholtem Stress vorbereitet werden (Jaskiewicz et al. 2011; Lämke and Bäurle 2017). DNA- und Histon-Methylierung, sind daher von zentraler Bedeutung für ein anhaltendes Priming, da sie als zelluläres Gedächtnis fungieren und Stressantworten kontrollieren. Epigenetische Modifikationen von Stressantwortgenen sind somit indikativ für eine nachhaltige Priming-Antwort und können herangezogen werden, um Aussagen über die Effektivität der eingehenden Primingbehandlung und die zu erwartende resultierende Toleranz zu treffen. Zudem ist die Identifizierung von Stressantwortgenen und genregulierenden Elementen von großem Wert für die Pflanzenzüchtung, da diese Informationen zur züchterischen Weiterentwicklung von Resistenzmerkmalen in Tomaten und anderen Nutzpflanzen beitragen können (Springer 2013).

Zusammenfassend kann somit festgestellt werden, dass 1) eine frühe Vorbehandlung an jungen Pflanzen mit folgender langanhaltender Stressresistenz möglich ist und 2) stressinduzierte epigenetische Veränderungen langfristig in der Züchtung von toleranteren Varietäten genutzt werden könnten. Auch bei erlangten mildereren Toleranz-Effekten, wie sie im Zusammenhang mit chemischem Priming diskutiert werden (Yassin et al. 2021) kann eine Kombination von verschiedenen schützenden Verfahren genutzt werden.

Vorteil des Anbaus in Gewächshauskulturen in dem hier untersuchten Ansatz ist, dass hier besonders für die Primingbehandlungen an den Jungpflanzen und auch später in den Gewächshauskulturen besser kontrollierte Umweltbedingungen vorliegen, die eine Temperaturführung gegen Kälte und eine konstante Grundernährung/Bewässerung der Pflanzen garantieren. Schwierigkeiten treten hingegen im Freilandanbau auf, hier wird diskutiert, dass die Wirkungen von z. B. chemischem Priming bei oft hoher Variation von Stressen und deren Kombinationen schwerer abzuschätzen sind (Yassin et al. 2021). Maßnahmen zur Stärkung von Jungpflanzen werden im Gartenbau bereits praktiziert. Eine Öffnung des sogenannten „Cabrio-Gewächshaus“ soll Jungpflanzen an Sonnenlicht und extremere Temperaturen im Freiland anpassen. Eine Immunisierung von Pflanzen gegen Pepinomosavir (PMV), das hohe Schäden in der Tomatenproduktion verursacht (Hanssen and Thomma 2010), wird durch eine Vorbehandlung mit einem milden Stamm (PMV, Produkt „PMV®-01“, Firma De Ceuster Meststoffen NV (DCM)) erzeugt. Das Priming von Samen ist eine weitere Nutzungsform (Raj and

Raj 2019) und wird in der Industrie angeboten z. B. durch die Firma „Incotec“ oder „Nunhems“, vor allem um Keimung unter widrigen Umständen zu ermöglichen. Durch Ähnlichkeiten bestehender Verfahren im Gartenbau ist eine hohe Akzeptanz und Anschlussfähigkeit des HortiPrimed-Verfahrens zu erwarten.

3. Material und Methoden

HortiPrimed hat mit einer aktuellen konventionellen Tomatenlinie Adeleza F1 (Enza Zaden Deutschland GmbH & Co. KG, Dannstadt-Schauernheim, DE) gearbeitet, wie sie in der Tomatenproduktion eingesetzt wird und mit zwei Tomatenlinien, die häufig für Laborversuche herangezogen werden und bereits sequenziert sind, „M82“ (Eshed and Zamir 1995; Menda et al. 2004; Bolger et al. 2014a) und zusätzlich mit der Sorte Moneymaker. (Viquez-Zamora et al. 2013). So wurden Analysen der epigenetischen Veränderungen und der Genexpression vereinfacht. Das Arbeiten mit diesen drei Linien ermöglichte dem Konsortium die relevante Praxisnähe und eine bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse in Hinblick auf bereits erfolgte Forschung an Tomate sowie die Ausdehnung der erlangten Ergebnisse in weitere Grundlagenforschung.

Alle Projektpartner bedanken sich für die Bereitstellung von Saatgut zu Forschungszwecken von der Firma Enza Zaden. Im Weiteren beschreiben wir die im Projekt genutzten Methoden zu den einzelnen Arbeitspaketen.

3.1. Material und Methoden in Arbeitspaket 1 Priming von Tomaten-Jungpflanzen gegen abiotischen Stress (Forschungszentrum Jülich, IBG-4, 2819NA061)

Pflanzenanzucht und Stressbehandlungen

Saatgut der Tomatensorte M82 (LA3475, CM Rick Tomato Genetics Resource Center, Univ. of California at Davis (Bolger et al. 2014a) wurde im Institut IBG-4 Forschungszentrum Jülich im Gewächshaus vermehrt. Saatgut der Tomatensorte Adeleza F1 wurden von der Firma Enza Zaden zur Verfügung gestellt. Die Samen wurden in kleinen Steinwollewürfeln (Grodan, 2 x 2 x 4 cm) in demineralisiertem Wasser gekeimt, dazu wurden sie in einer Klimakammer (Hühnen Kälte-Klima-Elektrotechnik, Erkelenz, Germany) bei einem Tag-Nacht-Rhythmus von 10 Stunden Tag und 14 Stunden Nacht und bei Temperaturen von 22 °C am Tag und 18 °C in der Nacht inkubiert. Die Luftfeuchtigkeit lag bei 55 - 60%.

Die Keimlinge wurden von der Aussaat an bis zum 6. - 10. Tag nach der Aussaat mit VE-Wasser gegossen. Vom 7. bis zum 11. Tag nach der Aussaat wurden die Keimlinge mit halbkonzentrierter Hoagland Nährlösung (Hoagland and Arnon 1950) gegossen und ab dem 14. Tag nach Keimung schließlich eine Woche in Hoagland Nährlösung angezogen. Am 21. – 24. Tag nach Aussaat wurden die Steinwolleblöcke in größere 7,5 x 7,5 x 6,5 cm Steinwollwürfel (Firma Grodan, Roermond, Niederlande) umgesetzt. Priming-Stressbehandlungen erfolgten in den verschiedenen Experimenten am 24. – 31. Tag nach Aussaat und dauerten immer 5 Tage. Dabei wurden die Pflanzen mit Hoagland-Lösung mit 200 mM NaCl versetzt, um ein Salz-Priming zu induzieren. Nach 5 Tagen Salz-Priming wurden die Grodanwürfel mit demineralisiertem Wasser ausgespült, um eine Erholungsphase in salzfreier Hoagland Lösung zu ermöglichen. Vollständiges Auswaschen des Salzes wurde mit einem EC-Messgerät überprüft. Priming bei Kälte oder Hitze erfolgte in baugleichen Klimakammern bei geänderter Temperatur. Kältestress wurde bei 12°C Tag/Nachttemperatur erzeugt und Hitzestress erfolgte bei Tagesbeginn für 5

Stunden bei 22 °C gefolgt von einem Hitzepeak von 40 °C für 4 Stunden. Die verbleibenden zwei Stunden des Tages lag die Temperatur dann wieder bei 22 °C, nachts wurde eine Temperatur von 20 °C eingestellt.

Nach einer Erholungsphase (10 Tage) wurden je 4-5 Replikate einem Folgestress von 7 bis 8 Tagen ausgesetzt. Dabei wurden Stresse gleich zum Primingstress angewandt (Cis-Priming) oder Toleranzen gegen andere Folge-Stress wurden getestet (Cross-Priming).

Die Salz-Primingbehandlungen und -Stresstoleranz wurden dann in Folge an einer produktions-relevanten Linie (Adeleza, Enza Zaden) überprüft.

Probennahme und Einzelblattmessungen

Alle individuellen Pflanzen wurden mit Barcodes gekennzeichnet und erhielten so eine individuelle Kennzahl. Einzelblattmessungen erfolgten am zweiten echten Blatt, als Proben für Untersuchungen zu Pflanzeninhaltsstoffen und zur Genexpressionsuntersuchung wurden die Fiederblätter von Laubblatt Nummer 2 und 3 (echte Blätter, gezählt beginnend nach den Kotyledonen), ohne Stängel zusammen beprobt, gewogen und direkt in Flüssigstickstoff schockgefroren. Verbleibende Pflanzenreste wurden zur Bestimmung von Frisch- und Trockengewicht sowie in einigen Experimenten zur Ermittlung der realen Pflanzenfläche mittels einem Leaf Area Meter (Li-3100C, Li-COR) abgeerntet. Ernten erfolgten nach der Erholungsphase und nach 24 Stunden und 8 Tagen im Salzstress („Stress 2“, Abb. 3.1.1) und die Bezeichnung der Behandlungen erfolgte wie in Tabelle 3.1.1. beschrieben mit zusätzlicher Zeitangabe.

Multispektrale Fluoreszenz Indizes zur Ermittlung von Chlorophyllgehalt (CHL), epidermalen Flavonoiden (FLAV) und Anthozyanen (ANTH) wurden mit dem Gerät Dualex®-Messgerät (Dualex Scientific+™, Force-A, Orsay, FRA bzw. Pessl Instruments, Weiz, AUT) vermessen (Cerovic et al. 2012). Dabei wurden am zweiten echten Blatt pro Messung drei Messpositionen gemessen.

Bereitstellung von Proben und Pflanzen nach Primingbehandlung

Proben mit deutlichem Priming-Effekt nach Salz-Priming wurden nach der 10-tägigen Erholung genommen und an Partner 4 zur epigenetischen Charakterisierung (AP4) übergeben. Dazu wurden mehrere Replikate angezogen, und zu Triplikaten gepoolt, um eine größerer Menge Blattmaterial zu erhalten (2 - 4 g). Diese wurden, wie für die RNA-Seq Untersuchung und Inhaltsstoffuntersuchung beprobt und auf Trockeneis versandt.

Auch für AP1.5 wurden größere Mengen Pflanzen angezogen, die nach Priming in Gewächshausversuchen bei Partner 2 und bei der Landwirtschaftskammer NRW in Straelen weiterkultiviert wurden.

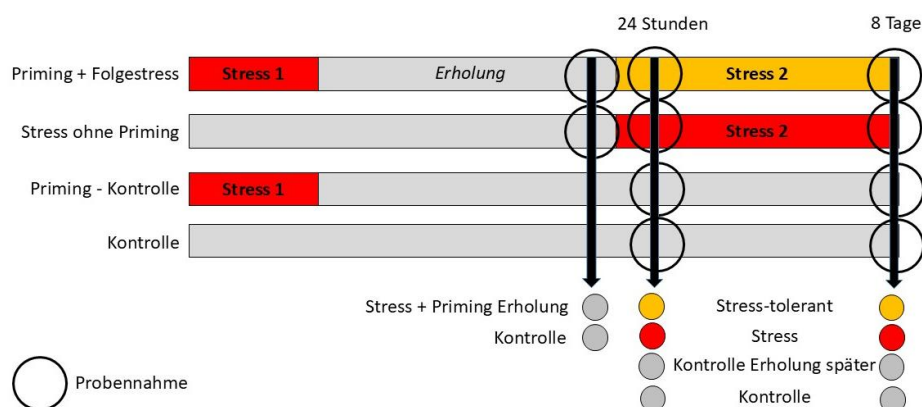


Abbildung 3.1.1: Experimentdesign und Probennahmen. Stress in rot, Stress bei Stresstoleranz in orange. Probennahme nach 10 Tagen Erholung, nach 24 Stunden und 8 Tagen Salzstress.

Tabelle 3.1.1: Probenbeschreibung

Behandlung	Bezeichnung	Priming	Stress
C	Control (Kontrolle)	Nein	Nein
P	Primed	Ja	Nein
CC	Control-Control	Nein	Nein
CS	Control-Stress	Nein	Ja
PC	Primed-Control	Ja	Nein
PS	Primed- Stress	Ja	Ja

Phänotypisierung

Die Primingintensität und Stresstoleranz gegen einen wiederholten Stress wurde mit verschiedenen nicht-invasiven Techniken quantifiziert, dabei wurden Größe, Wachstum und Morphologie, und Farbveränderungen Fotos aus einer Fotobox (Abb. 3.1.2) quantifiziert (Genzel et al. 2021; Junker-Frohn et al. 2019). Dazu wurden je 4 Fotos von jeder Pflanze in der Fotobox um je 90° gedreht aufgenommen. Die projizierte Blattfläche (projected leaf area, PLA) und Farbwerte wurde aus den Bildern aussegmentiert, in Pixeln berechnet und gemittelt (Genzel et al. 2021; Junker-Frohn et al. 2019). Die PLA wurde zu realer Blattfläche (Leaf Area Meter) und zum Frischgewicht verglichen, um die nicht-invasive Größenbestimmung zu überprüfen (Abb.3.1.3).

Relatives Wachstum wurde nach folgender Formel berechnet:

$$RGR_{PLA} \left(\frac{\%}{t} \right) = \left(\frac{\ln(PLA_{t2}) - \ln(PLA_{t1})}{t_2 - t_1} \right) \times 100$$

Außerdem wurde eine Stresstoleranz nach folgender Formel ermittelt:

$$Stresstoleranz (\%) = \left(\frac{gestresst}{Kontrolle} \right) \times 100$$



Abbildung 3.1.2: Photobox und Aufnahme von Drehtisch, Kamera und LED-Paneele zur gleichmäßigen Beleuchtung der Aufnahmen (oben). Segmentierung der „Projizierten Blattfläche“ (rechts unten) einer Tomatenpflanze, nach Aufnahme in der Photobox (links unten).

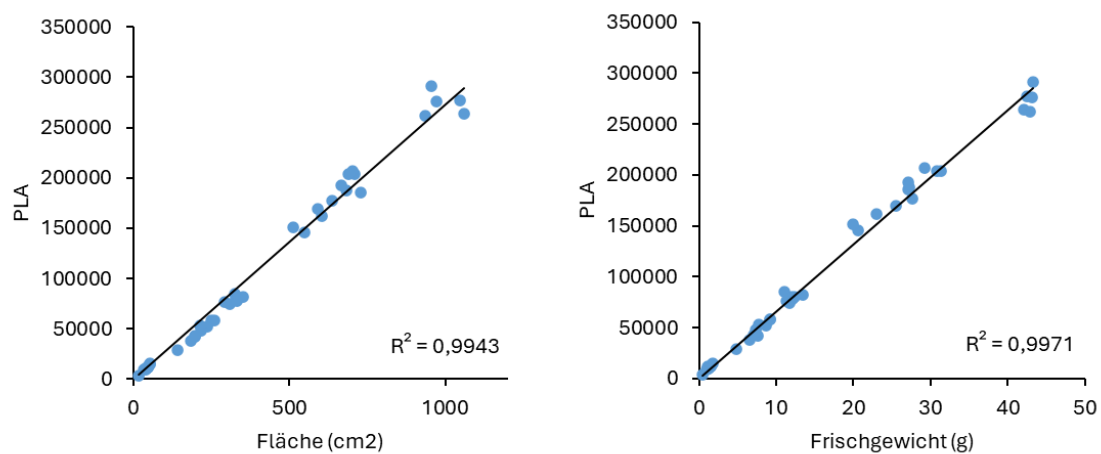


Abbildung 3.1.3: Korrelation der ermittelten projizierten Blattfläche (PLA) zu realer Blattfläche und zum Frischgewicht der Pflanzen. Pflanzen zu verschiedenen Erntezeitpunkten und unter Kontrollbedingungen oder Salzstress angezogen.

Phenolbestimmung

Die Extraktion für die Bestimmung des Phenolgehaltes der einzelnen Pflanzenproben erfolgte nach einem modifizierten Extraktionsprotokoll von (León-Chan et al. 2017).

Für die Extraktion wurden ca. 15-20 mg gefrorenen Blattpulvers in 1 ml kaltes (bei -20 °C gelagert) 95 % MeOH gegeben. Nach kurzem Schütteln wurde ein weiterer Milliliter 95 % MeOH zugegeben. Die Proben wurden dann bei 4 °C und 900 rpm für 30 min auf einem Schüttler inkubiert. Abschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 4 °C für 5 min bei 14.000 rpm und der Überstand wurde für die Bestimmung des Phenolgehaltes verwendet.

Die Bestimmung der Gesamtphenole erfolgte nach dem Messansatz von (Ainsworth and Gillespie 2007). Als Referenz wurde eine Eichkurve mit Gallussäure erstellt. 100 µl des zuvor gewonnenen Überstandes des Probenextraktes wurden mit 200 µl Folin-Ciocalteu-Reagenz (0,2 N) versetzt und gemischt. Danach erfolgte die Zugabe von 800 µl Na₂CO₃ (0,7 M). Dann erfolgte eine zweistündige Inkubation im Dunkeln bei Raumtemperatur. Abschließend wurden die Proben bei 14.000 rpm für 1 min zentrifugiert. Für den Überstand wurde die Absorption bei 765 nm bestimmt.

Anthocyanbestimmung

Die Extraktion der Anthocyane erfolgte nach dem Protokoll von (Sims and Gamon 2002) und wurde mit der Verwendung von Chloroform nach (Neff and Chory 1998) modifiziert. 15-20 mg des gefrorenen und zerkleinerten Blattpulvers wurden mit 1 ml kaltem Extraktionspuffer (Methanol (100 %) : Salzsäure (32 %) : Wasser im Verhältnis 90 : 1 : 1 (v/v), bei -20 °C gelagert), gemischt und mit einem weiteren Milliliter Extraktionspuffer versetzt. Nach 1 h im Schüttler bei 4 °C und 900 rpm wurden die Proben bei 4 °C und 14.000 rpm für 5 min zentrifugiert. 600 µl des Überstandes wurden mit 400 µl VE-Wasser und 1 ml Chloroform versehen, gevortext und anschließend erneut bei 4 °C und 14.000 rpm für 5 min zentrifugiert. Während sich die Anthocyane in der Methanol-Wasser-Phase lösen, reduzierte das Chloroform eine Verunreinigung durch lichtabsorbierende Stoffe und reicherte u. a. Chlorophylle und Carotinoide in der unteren organischen Phase an (Solovchenko et al. 2001). Die Absorption der oberen Phase wurde im Photometer bei 530 nm und 657 nm bestimmt. Nach einer Korrekturrechnung der Absorption nach (Jayakumar et al. 1999) wurde der Anthocyangehalt mithilfe eines Extinktionskoeffizienten aus der Literatur von 26.900 L / mol × cm bei 530 nm berechnet (Li et al. 2021b).

Genexpressionsstudien: RNA-Extraktion, realtime qPCR und RNA-Sequenzierung

RNA-Extraktion

Nach Etablierung der RNA-Extraktion mit dem Qiagen® RNAeasy Plant Mini Kit und unter Nutzung einer Baseline Zero-DNase-Behandlung (Lucigen, USA) und anschließender Aufreinigung über RNA bindende Säulen aus dem Qiagen® RNAeasy Plant Mini Kit wurde RNA in RNA-Sequencing-Qualität isoliert. RNA-Konzentration und -Qualität wurde mit einem NanoDrop™ 2000c Spektrophotometer (Thermo Scientific™), einem Qubit™ 4 Fluorometer (Thermo Scientific™) und einem Bioanalyzer Agilent 2100 (Agilent Technologies, USA) bestimmt.

Real time qPCR

Für die realtime qPCR mit einem CFX Opus 384 Real-Time PCR-System (Bio-Rad) wurde zunächst die RNA mit einem iScript™ cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher) reverse transkribiert und 1:20 verdünnt. Die Abwesenheit von genomischer DNA wurde mittels nicht-reverser transkribierter

RNA-Proben (NRT) überprüft. Die Amplifikation wurde in einer Reaktionsmischung mit 5 µL iQ SYBR Green Super mix (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA), 1 µL Primer Mischung aus Vorwärts- und Reversprimer, 600 nM und 4 µL cDNA für jede Probe und jedes Gen enthielt. Das PCR-Programm begann mit der Aktivierung der Polymerase bei 95 °C für 3 min, gefolgt von 39 Zyklen der cDNA-Denaturierung bei 95 °C für 10 s, Annealing und Amplifikation bei 60 °C für 30 s und einer Schmelzkurvenanalyse bei 65 - 95 °C mit einem Schritt von 0,5 °C und 5 s pro Schritt am Ende. Die Ct-Werte, die Normalisierungsfaktoren und die Genexpression wurden für die über Literatur vor-ausgewählten Markergene mit dem *Relative Expression Software Tool* = *REST* (Pfaffl et al. 2002) und mit der CFX Maestro Software Version 2.3 (Bio-Rad-Laboratories) berechnet. Effizienzen der PCR-Reaktion wurden mit dem Algorithmus Miner 4.0 erstellt (Zhao and Fernald 2005).

Zur Normalisierung der Expressionsdaten wurden die zwei Referenzgene *ACTIN* und *Proteinphosphatase 2A (PP2Acs)* verwendet und mit RefFinder (Xie et al. 2023) auf ihre Expressionsstabilität stabil überprüft. Die Primer für *Actin* (TC194780, *Solanum lycopersicum*) wurden selbst designed und die Primer für die katalytische Untereinheit der Proteinphosphatase 2A (*PP2Acs*, AY325817) wurden aus (Løvdal and Lillo 2009) ausgewählt. Markergene für Priming und Salzstress wurden zunächst anhand der Literatur ausgewählt. Es wurden zwei Gene aus dem Biosyntheseweg phenolischer Sekundärmetabolite ausgewählt, eine Dihydroflavonol-4-Reductase (DFR, Solyc02g085020.2, m82_HG975514.1_001020.1) und eine Flavonol-Synthase (FLS, Solyc11g013110.1, m82_HG975523.1_000368.1). Weiterhin wurden Homologe zur Salzstress-responsiven und Priming responsive P5CS1 Delta-1-pyrroline-5-carboxylate Synthase 1 (Feng et al. 2016) und zum Plasmamembran Na⁺-H⁺ Antiporter aus Arabidopsis SOS1 (Shi et al. 2000) ausgewählt. Später wurden differenziell exprimierte Gene aus der RNA-Sequenzierung (Tabelle 3.1.2) in RT-qPCR quantifiziert, um Expressionsänderungen zu bestätigen. Primer für solche ausgewählten Markergene wurden über die BLAST Funktion in Quantiprime (Arvidsson et al. 2008) erstellt, alle Primersequenzen sind in Tabelle 3.1.3 dargestellt.

Tabelle 3.1.2: ausgewählte Gene aus der RNA-Sequenzierung, die in RT-PCR überprüft wurden

Gene ID	Funktion (Mercator4.0)	Primernamen
m82_HG975520.1_000427	zinc transporter (AHRD V3.3 *** AT1G10970.2)	ZincT
m82_HG975521.1_000850.1	Flavonoid 3,5-methyltransferase	F35MT
m82_HG975521.1_000889.1	PR6 protease inhibitor	PR6PI
m82_HG975518.1_002503.1	Asparagine Synthetase ASN1	ASN1
m82_HG975522.1_001830.1	Anion transporter *(NRT1/PTR) M82_10g024490.2.1	NRT1
m82_hg975514.1_000832.1	anthocyanin glutathione S-transferase *(TT19)	TT19
m82_hg975514.1_001968.1	abscisic acid and environmental stress inducible protein tas (Solyc02g084850.3.1)	TAS14
m82_hg975515.1_000242.1	CEN-like protein 1 Solyc03g026050 terminal flower 1	CEN1.1
m82_hg975517.1_000061.1	Two-component response regulator ARR3	ARR3
m82_hg975518.1_002241.1	Two-component response regulator ARR17	ARR7
m82_hg975521.1_000413.1	Non-specific lipid-transfer protein 1	SILTPb
m82_HG975515.1_001520	Auxin-binding protein ABP19a	ABP19a
m82_hg975519.1_002054.1	defensin *(PDF2)	DEF4
m82_hg975519.1_000065.1	defensin *(PDF2)	DEF5

Tabelle 3.1.3: Primersequenzen

Genname	Primer Sequenz (5' → 3')	Referenz
ACTIN	TCCACATGCCATTCTCCGTC	Accession number TC194780
	CGCTCGGTCAGGATCTTCAT	
PP2Acs	CGATGTGTGATCTCCTATGGTC	(Løvdaal & Lillo, 2009)
	AAGCTGATGGGCTCTAGAAATC	
DFR	TCCTGTATGAGCACCCCAAG	QUANTPRIME
	AAGACACTACGGGCAAGTCC	
FLS	TAAGATTGGCCTCCTCCTG	QUANTPRIME
	ACCAAGCCCAAGTGATAAGC	
P5CS1	GACGGTCTTTACAGTGGTCCTC	Accession number U60267.1
	AGCAGCTTTTACTTTGGCAGTC	
SOS1	GAAAGTTTTGAATTGCCTCACC	Accession number AB675690.1
	CTTCTGTGTTGTGGAAGCTTTG	
ZincT	AAGACCCTTGCTCGTAGCGTTG	RNA Seq und QUANTPRIME
	ACTGTGCCTGTGAGATGCAACC	
F35MT	AGAACTCACACAAGCCTCATTCCG	RNA Seq und QUANTPRIME
	ATCTCGAGGCACACCCATCAAG	
PR6PI	CATCTTGGTGCAAAGGAAAACA	RNA Seq und QUANTPRIME
	TCCTTTGTGACTGGAGAACCA	
ASN1	AGGAGCAACCGTATCTTCCAAAGC	RNA Seq und QUANTPRIME
	AGCCTACGCCATCGCTGAATTG	
NRT1	TCCAGCAAGCATGTCTAGTTTCG	RNA Seq und QUANTPRIME
	ACGAGTCCAACTCCCATCCTTTG	
TT19	TTACAGCCATTTGGACAGGTTCC	RNA Seq und QUANTPRIME
	GTCGTTCCGGTTAGTTTCTTTCCC	
TAS14	TGGAAGCTAAGGCATGGGTACTG	RNA Seq und QUANTPRIME
	TTCTCCATCATCCTCCGACGAG	
CEN1.1	GAACATCTCCACTGGATTGTGACG	RNA Seq und QUANTPRIME
	TCGTAGCACACTATCTCCCTTCC	
ARR3	ACTGTGGATAGTGGGATGAGA GC	RNA Seq und QUANTPRIME
	GATCCACCTTCAAACCATCAATGC	
ARR7	AGA GTA TTT GGG TTT GGC AGC TC	RNA Seq und QUANTPRIME
	TCCTTCATCATCGACGATTCTTG	
SILTPb	GCAAAGCTGCTGATCTTCCTTCC	RNA Seq und QUANTPRIME
	ATCATCAACCTTAGCGGACCTTG	
ABP19a	CTGCAGCCCGTTTAGATTGGC	RNA Seq und QUANTPRIME
	TTCAGAAGCACCAGGGTGAGTG	
DEF4	ATGCTTGTCATGGCTACTGGAC	RNA Seq und QUANTPRIME
	CCGAGGCACAATTCTTCTCACTC	
DEF5	TCACTCATTCCATGGCTCGTTCC	RNA Seq und QUANTPRIME
	TCCTGGGAAAGTTTGGCTTGGTG	

RNA Sequenzierung und Genexpressionsanalyse

Zur RNA Sequenzierung wurden folgende Proben in 3 biologischen Replikaten verwendet (vgl. Tabelle 3.1.1):

- C und P nach der Erholungsphase
- CC, CS, PC und PS nach 24 Stunden und 8 Tagen Salzbehandlung.

Die Sequenzierung wurde von dem externen Serviceprovider Novogene auf einer Illumina NovoSeq X Plus-Plattform mit 2 × 150 bp Paired-End mit insgesamt 20 Millionen Reads durchgeführt. Die bereitgestellten Roh-Reads wurden mit Trimmomatic v0.39 (Bolger et al. 2014b) getrimmt, das M82-Genom der Tomate (Bolger et al. 2014a) wurde als Referenz für die Transkriptgenerierung durch strukturelle Genvorhersage mit dem Deep-Learning-Tool Helixer v0.3.2 (Stiehler et al. 2021; Holst et al. 2023) verwendet. Die funktionale Genannotation wurde mit Mercator4 v6 (Bolger et al. 2021) durchgeführt. Die Quantifizierung von Transkripten wurde mit Salmon v1.10.1 (Patro et al. 2017) durchgeführt, und die differenzielle Genexpressionsanalyse wurde mit DESeq2 in R (Love et al. 2014) durchgeführt. Signifikant veränderte Transkripte wurden auf der Grundlage von log2-Fold-Change-Schwellenwerten (> 1 oder < -1) zwischen den Behandlungen zu verschiedenen Zeitpunkten identifiziert.

Vergleichende Analysen von Salz cis-Priming und Kontrollproben wurden wie folgt durchgeführt: (i) salzgeprimte Pflanzen gegenüber nicht geprimten Pflanzen (Kontrolle) nach der Erholungsphase (P vs. C), (ii) nicht geprimte Pflanzen unter Salzstress („CS“, Tabelle 3.1.1) gegenüber nicht geprimten Pflanzen unter Kontrollbedingungen („CC“ Tabelle 3.1.1) nach 24 Stunden und 8 Tagen nachfolgendem Salzstress (CS vs. CC_24h bzw. CS vs. CC_8d), (iii) salzgeprimte Pflanzen im Salzstress („PS“, Tabelle 3.1.1) gegenüber nicht geprimten Pflanzen im Salzstress („CS“, Tabelle 3.1.1) nach 24 Stunden und 8 Tagen nachfolgendem Salzstress (PS vs. CS_24h bzw. PS vs. CS_8d) und (iv) salzgeprimte Pflanzen im Salzstress (PS, Tabelle 3.1.1) gegenüber salzgeprimten Pflanzen unter Kontrollbedingungen („CS“ Tabelle 3.1.1) nach 24 Stunden und 8 Tagen (PS vs. PC_24h bzw. PS vs. PC_8d).

Tabelle 3.1.4: Vergleiche in der Genexpressionsstudie, Behandlungen wurden in Proben nach 24 Stunden und 8 Tagen betrachtet

Vergleich	Erläuterung
P vs. C	Expression in geprimten Pflanzen nach der Erholungsphase
CS vs. CC	Expression bei Salzstress in ungeprimten Pflanzen
PS vs. PC	Expression bei Salzstress in geprimten Pflanzen
PS vs. CS	Expression unter Salzstress, durch Priming verstärkt

Um die biologischen Unterschiede zwischen diesen Vergleichen zu bewerten, führten wir eine Mercator4 BIN-Anreicherungsanalyse durch (Bolger et al. 2021). Diese Analyse bewertete eine statistische Über- und Unterrepräsentation von Genen innerhalb spezifischer „Mercator4 BINs“, die Gruppen mit biologischen Funktionen repräsentieren. Es wurden Venn-Diagramme mit Venny

2.1 (Oliveros 2007) erstellt, um die Überlappung signifikanter Transkripte über die verglichenen Bedingungen hinweg darzustellen.

Statistische Auswertung

Alle Daten sind, wenn nicht anders angegeben, als Mittelwert $\pm$ Standardabweichung (SD) dargestellt und mittels Einweg-ANOVA und Tukey-Post-hoc-Test mit einem P-Wert $< 0,05$ unter Verwendung der R-Software und des Pakets „agricolae“ (de Mendiburu and de Mendiburu 2023) oder mit der Software Origin (OriginLab) analysiert. Daten zur Realtime PCR wurden in CFX Maestro Software Version 2.3 (Bio-Rad-Laboratories) berechnet.

3.2. Material und Methoden in Arbeitspaket 2: Priming gegen biotischen Stress/Schadorganismen (Universität Bayreuth, Partner 5, 2819NA125)

Pflanzenmaterial und Wachstumsbedingungen

In dieser Studie wurden drei Tomatensorten (*Solanum lycopersicum* L.) verwendet. Neben der Sorte M82, wurden die Anwendungssorte Adeleza sowie die Sorte Moneymaker inkludiert. Initial wurden Tomaten Jungpflanzen auf Erde angezogen und etwaige Salz- oder Kontrollbehandlungen der Bewässerung hinzugefügt. Da die Behandlung nicht ausgewaschen werden konnte, wurden die Anzuchtbedingungen zum offiziellen Projektbeginn von AP2 an die in AP1 etablierten und vom Praxisbeirat angeregten Bedingungen angepasst und im restlichen Verlauf des AP2 durchgehend ausgeführt. Dabei wurden zu Beginn eines Versuchs Samen auf Steinwollwürfel (Grodan B.V., Roermond, Niederlande) gesät. Zu diesem Zweck wurden die Steinwollwürfel für etwa 1 Stunde in entmineralisiertes Wasser gelegt. Nach der Aussaat und dem Abdecken der Blöcke mit Frischhaltefolie wurden sie bis zur Keimung nicht bewässert, da die Würfel ausreichend Feuchtigkeit speicherten. Die Keimlinge waren nach etwa 7 Tagen sichtbar. In diesem Stadium wurden die Blöcke in eine halbstarke Hoagland-Nährlösung mit einem pH-Wert von 6 und einer elektrischen Leitfähigkeit (EC) von 1,0-1,5 mS/cm gestellt. Nach der Entwicklung der ersten echten Blätter wurde eine vollwertige Hoagland-Lösung verwendet. Die Hoagland-Nährlösung enthielt 5 mM KNO₃, 5 mM Ca(NO₃)₂, 2 mM MgSO₄, 1 mM KH₂PO₄, 1 mM Fe-EDTA und die Spurenelemente MnCl₂ (~4 nM), CuSO₄ (~1,6 nM), ZnSO₄ (~1 nM), H₃BO₃ (~50 nM) und Na₂MoO₄ (~0,7 nM). Die Pflanzen wurden in einer GroBank (CLF PlantClimatics GmbH, Wertingen, Deutschland) bei einer photosynthetischen Photonenflussdichte von ~125 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ für 16 Stunden pro Tag bei 22°C (und 8 Stunden pro Nacht bei 19°C) gezogen. Für Salz-Priming Experimente wurden 15 Tage alte Sämlinge der Sorte Adeleza und 20 Tage alte Sämlinge der Sorten Moneymaker und M82 verwendet.

Salz-Priming

Um das Priming auszulösen, wurden Keimlinge dem Salz NaCl ausgesetzt. Zu diesem Zweck wurden Steinwollwürfel mit Tomatensämlingen 5 Tage lang in 1x Hoagland-Lösung mit 200 mM NaCl (EC ~20 mS/cm) getaucht. Die Kontrollbehandlung wurde auf die gleiche Weise ohne NaCl-Zusatz zum Medium durchgeführt. Anschließend wurden die Steinwollwürfel mehrmals mit Wasser gewaschen, bis die EC des verbleibenden Wassers 3-4 mS/cm oder weniger erreichte. Anschließend wurden die Keimlinge in Töpfe (13 x 13 x 13 cm; Growland, Rome International GmbH & Co. KG, Hamburg, Deutschland) mit Erde (Standarderde „Substrato Multiplicazione“, Floragard Vertriebs-GmbH, Oldenburg, Deutschland) umgesetzt und unter den

oben beschriebenen Bedingungen 10 Tage lang angezogen. Proben für Genexpressionsanalysen wurden 10 Tage nach dem Umsetzen der Pflanzen in die Erde vom zweiten echten Blatt der NaCl-behandelten und der Kontrollpflanzen entnommen (Abb. 3.2.1). Genexpressionsanalysen wurden an gepoolten Proben durchgeführt, die jeweils Blätter von mindestens drei Pflanzen (pro biologisch unabhängiges Replikat) enthielten.

Vermehrung der Pathogene und Durchführung der Infektionen

Pathogeninokulationen von Salz- und kontrollbehandelten Pflanzen wurden in allen Experimenten auf dem zweiten echten Blatt der Pflanzen durchgeführt; die Blatinokulationen erfolgten 10 Tage nach dem Umsetzen der Pflanzen auf Erde (Abb. 3.2.1).

Pseudomonas syringae

P. syringae pathovar *tomato* (Pst/DC3000) wurde wie beschrieben gezüchtet und für die Inokulation der Pflanzen verwendet (Wenig et al. 2019). Inokuli wurden durch Suspendieren von plattengezüchteten Bakterien aus einer Ü/N-Kultur in 10 mM MgCl₂ hergestellt. Anschließend wurden die Bakterien verdünnt, um eine OD₆₀₀ von 0,0002 zu erreichen. Die Blatinokulation wurde daraufhin mit einer Spritze ohne Nadel durchgeführt. Die Blattinfiltration mit 10 mM MgCl₂ diente als Versuchskontrolle. Proben für Genexpressionsanalysen wurden 24 Stunden nach der Inokulation (hpi) entnommen. Die Vermehrung von DC3000 in den inokulierten Blättern wurde 3 (M82) und 4 Tage (Moneymaker) nach der Inokulation (dpi) wie folgt überwacht: 3 Blattscheiben (6 mm Durchmesser) pro Probe wurden in 70%igem Ethanol oberflächensterilisiert und in 10 mM MgCl₂ mit 0,01% (v:v) Silwet bei Raumtemperatur geschüttelt (600 Umdrehungen pro Minute). Die Proben wurden daraufhin seriell in 10-fachen Schritten verdünnt, und 20 µl pro Verdünnung wurden auf NYGA-Medien (5 g/l Proteasepepton, 3 g/l Hefeextrakt, 20 ml/l Glycerin, 18 g/l Agar) (mit 50 µg/ml Rifampicin und 50 µg/ml Kanamycin) plattiert. Nach 2 Tagen Bebrütung bei 28 °C wurden die Bakterienkolonien gezählt und die Titer in den Blättern berechnet.

Alternaria alternata* und *Botrytis cinerea

Alternaria alternata und *Botrytis cinerea* wurden auf Malzextrakt-Agar (MEA; 30 g/l Malzextrakt, 15 g/l Agar) angezogen. Die Kulturen wurden 7 Tage lang im Dunkeln bei Raumtemperatur bebrütet. Anschließend wurden sie 20 Tage lang natürlichem Tageslicht ausgesetzt. Sporen der Pilze wurden gesammelt und in einer Sporenlösung (8,5 g/l Na₂HPO₄, 2 g/l Glukose; pH= 6) für die Blatinokulation suspendiert. Die Sporen wurden in 1 µl der Sporenlösung unter einem Lichtmikroskop (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland) gezählt. Sporenlösungen, die 5-50 Sporen/µL von *A. alternata* (die Sporendichte hing von der Jahreszeit ab) oder ~10 Sporen/µL von *B. cinerea* enthielten, wurden auf die Pflanzenblätter aufgebracht, indem wie beschrieben (AbuQamar et al. 2008) 5 µL-Tropfen auf die Blattoberfläche pipettiert wurden. Für Genexpressionsanalysen wurde dieselbe Sporenlösung durch Sprühinokulation auf ganze Blätter aufgebracht. Die inokulierten Pflanzen wurden 48 Stunden lang bei Raumtemperatur unter einer durchsichtigen Haube gehalten, um feuchte Bedingungen zu schaffen, die für die Pilzentwicklung günstig sind. Proben für Genexpressionsanalysen wurden 24 hpi entnommen (Abb. 3.2.1); Blätter von drei Pflanzen wurden pro Wiederholungsprobe gepoolt. Um *A. alternata*- und *B. cinerea*-induzierte Läsionen zu quantifizieren, wurden 10 mm große Blattscheiben 7 dpi geerntet und fotografiert und die befallene Fläche mit dem ImageJ-Makro PIDIQ (Laflamme et al. 2016) quantifiziert.

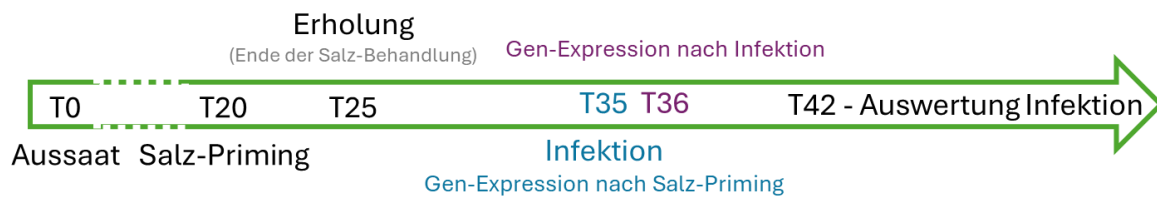


Abbildung 3.2.1: Zeitschiene eines Salz-Priming Versuchs mit der Tomatensorte M82. Eingezeichnet sind Aussaat (Tag (T) 0), der Beginn (T20) und das Ende (T25) der Salz-Priming Behandlung, sowie die Infektion (T35), inklusive Ernte-Zeitpunkten für Genexpressionsanalysen vor (T35) und 24 Stunden nach der Infektion (T36) und beispielhaft die Auswertung der *A. alternata* Läsionen an T42. Die Versuche inkludierten eine 10-tägige Erholungsphase zwischen der Salz-Priming Behandlung und der Infektion.

Für die Inokulation von Früchten der Tomatenpflanzen der Sorten Moneymaker und M82 mit *A. alternata* wurde die Haut der Früchte mit einem Skalpell leicht angeschnitten und 5 µl einer wie oben beschrieben hergestellten Sporenlösung appliziert. Die inokulierten Früchte wurden auf der Fensterbank im Labor an Tageslicht exponiert und die *A. alternata* Läsionen 7 bis 10 dpi fotografiert und ausgewertet.

Analyse des Pflanzenwachstums in Langzeitexperimenten

Die Auswirkungen des Salz-Primings auf die Wachstumsparameter der Pflanzen wurden im Zeitverlauf gemessen. Zu diesem Zweck wurden die Pflanzen 10 Tage nach dem Salz-Priming in ein Gewächshaus gebracht. An warmen Tagen wurde das Gewächshaus durch Schattierung passiv gekühlt. Die Höhe der Pflanzen und die Anzahl der Blüten wurden 78, 92 und 104 Tage nach der Aussaat (= 53, 67 und 79 Tage nach der Salz-Priming Behandlung) gemessen. Reife Früchte der Pflanzen wurden geerntet und wie oben beschrieben mit *A. alternata* infiziert.

RNA-Extraktion und Sequenzierung

Gesamt-RNA aus den geernteten Proben wurde entweder mit der TRIzol-Methode (Meng and Feldman 2010; Anwendung: RT-qPCR) oder mit einer säulenbasierten Methode (RNeasy Plant Mini Kit, QIAGEN; Anwendung: RNA-Sequenzierung) isoliert. Die RNA-Sequenzierung wurde durch Novogene Co. Ltd (Cambridge, UK) durchgeführt. Bibliotheken für die Paired-End-Sequenzierung von mRNA wurden von Novogene Co. Ltd wie beschrieben mit dem NEBNext® UltraTM RNA Library Prep Kit (Illumina®, NEB, USA) gemäß den Anweisungen des Herstellers hergestellt (Brambilla et al. 2022). Indexcodierte Proben wurden mit dem PE Cluster Kit cBot-HS (Illumina) auf einem cBot Cluster Generation System geclustert. Paired-End-Reads wurden durch Sequenzierung der Bibliotheken auf einer Illumina-Plattform erzeugt.

Analyse der RNA-Sequenzierungsdaten

Die RNA-Sequenzierungs-Reads wurden mit der nf-core/rnaseq-Pipeline (v3.10.1) (Patel et al., 2024) in Nextflow (v22.10.6) verarbeitet, wobei Singularity-Container auf dem Hochleistungsrechner-Cluster am Helmholtz Zentrum München verwendet wurden. Für das Trimmen/Filtern der Reads, die Alignment- und Quantifizierungsschritte mit Trim Galore!, STAR und Salmon wurden die Standardparameter und die zusätzlichen STAR-Alignment-Parametern „--alignIntronMax 100000 --alignSjoverhangMin 3“ verwendet. Als Referenzsequenz und Genomannotation dienten öffentlichen Versionen der Sorte M82 (Alonge et al., 2019). Transkriptmengen-Schätzungen von Salmon wurden verwendet, um Gen-basierte Zählmatrizen zu erstellen. Die Identifizierung der differentiell exprimierten Gene (DEGs) wurde wie beschrieben

durchgeführt (Brambilla et al. 2022). DESeq2 (Love et al. 2014) wurde in der R-Umgebung (R-Development-Core-Team 2020) verwendet, um DEGs bei einem p-Wert $<0,05$ nach der Kontrolle für Mehrfachtests mit dem Benjamini-Hochberg-Verfahren zu identifizieren. Die Visualisierung der Ergebnisse wurde mit ggplot (Wickham 2016), ggpubr (Kassambara 2020) und ggVennx (Yan 2021) durchgeführt.

Reverse Transkriptase-quantitative PCR (RT-qPCR) zur Analyse der Genexpression und Validierung der DEGs

cDNA wurde aus der Gesamt-RNA unter Verwendung von Superscript II Reverse Transkriptase (Invitrogen, ThermoFisher Scientific, Carlsbad, USA) und Oligo-dT-Primern erzeugt. Die quantitative PCR (qPCR) wurde mit dem Sensimix SYBR low-rox Kit (Bioline Reagents Ltd., London, UK) auf einem qTOWER3 qPCR-System (Analytik Jena GmbH, Jena, Deutschland) durchgeführt. Die Genauigkeit der DEGs mit unterschiedlichen Expressionsmustern, die aus den RNA-Sequenzierungsdaten gewonnen wurden, wurde durch RT-qPCR-Analyse überprüft. Die Primer, die für die qPCR verwendet wurden, sind in Tabelle 3.2.1 aufgeführt. Die Transkriptakkumulation der Zielgene wurde mit der $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode (Livak and Schmittgen 2001) analysiert.

Statistische Analyse der Daten

Alle statistischen Analysen wurden mit GraphPad Prism 9 (Boston, Massachusetts, USA) durchgeführt. Für die Analyse der Bakterientiter wurde die statistische Signifikanz mittels einseitiger Varianzanalyse (ANOVA) und anschließendem Tukey-Test ($p < 0,05$) ermittelt. Für die Analyse der Wachstumsparameter und des durchschnittlichen Prozentsatzes der Blattkrankheitsfläche wurde ein ungepaarter, zweiseitiger Student's *t*-Test verwendet. Unterschiede wurden bei $p < 0,05$ als statistisch signifikant angesehen.

Tabelle 3.2.1: Primer Sequenzen für RT-qPCR Analysen in AP2. NA, not applicable

Genname	Primer Sequenz (5' → 3')	Referenz
ACTIN	CGGTGACCACTTTCCGATCT	https://www.nature.com/articles/s41598-021-97854-8
	TCCTCACCGTCAGCCATTTT	
TIP41	ATGGAGTTTTTGAGTCTTCTGC	https://www.nature.com/articles/s41598-021-97854-8
	GCTGCGTTTCTGGCTTAGG	
PR1	GGATCGGACAACGTCCTTAC	https://bsppjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/mpp.12085
	GCAACATCAAAAGGGAAATAAT	
LEA6	TGCTAGTGAGTTTGGGTAAGGA	https://bmcplantbiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12870-022-03953-7
	GCCGCTATGTGAGAGTGGA	
LE25	GGAGAAAACCAAAGCCAATG	https://academic.oup.com/plcell/article/27/6/1579/6096484
	CCAGTAGTTCCAGTTCCAGTG	
PDF1.2	AAAAAGTGGCAAGTGGAATGG	https://www.frontiersin.org/journals/plant-science/articles/10.3389/fpls.2023.1179605/full
	AATGGCAAGGTGAGTAGCAGTAA	
MYB52	TGGAGACAGATGCCCAA	https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/pbi.13448
	TTCCGTGGTAAAGGGTCCT	
Jasmonate zim-domain	GGAGTTTAGGCTTATGCCACCTTC	https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0075728
	GGCTCAGATATTGGTGACAGACTC	
Aspartic proteinase	GCGGTGGATGATTCAAGCTC	NA
	GGCAAATCCATGTCTGCACC	
PR4	AGCGTTTACTGCGCTACCTG	NA
	TCACCCTCAAGCATCTACCG	
Cytochrome P450	TGTCCTGGAGAAGGATTGGC	NA
	AGGCAAGGTGAGTCCAGTTC	
Receptor-like protein kinase	CGAGTGGAGGACGATGTCAAG	NA
	CCAATGCAACCGAGAAGTGTG	
Peroxidase	CAGAACAGCAAGCCAAGGTG	NA
	TGAGCACCAGATAAGGCCAC	

3.3. Material und Methoden in Arbeitspaket 3: Priming und Priming-Effekte während der Fruchtproduktion (Hochschule Geisenheim, 2819NA123)

Allgemeine experimentelle Bedingungen

Alle Experimente wurden an der Hochschule Geisenheim durchgeführt und verwendeten die Tomatensorte *Solanum lycopersicum* L. var. Adeleza F1 (Enza Zaden Deutschland GmbH & Co. KG, Dannstadt-Schauernheim, DE) oder die Sorte M82 (LA3475, CM Rick Tomato Genetics Resource Center, Univ. of California at Davis (Bolger et al. 2014a), die in Geisenheim vermehrt wurde (Experiment 4 und 6). Die Samen wurden in Multitopfplatten („HerkuPak D 77“, Herkuplast Kubern GmbH) mit dem Substrat „Floradur A“ (Floragard Vertriebs-GmbH, Saterland, DE) oder „ORANGE Pikier“ (PATZER ERDEN GmbH, Sinntal-Altengronau, DE) ausgesät. Eine Woche nach der Aussaat (WAS) erfolgte das Hitze-Priming (Hitze-Priming) in Klimakammern (Fitotron® HGC 0714, Weiss Technik GmbH, Reiskirchen, DE) bei 40 °C über einen Zeitraum von sieben Tagen durchgeführt. Die täglichen Behandlungen dauerten 90 min (11:30 bis 13:00 Uhr), sofern nicht anders angegeben, und beinhalteten eine 30-minütige Aufwärm- und Abkühlphase. Die Klimabedingungen in den Klimakammern umfassten eine Lufttemperatur von 22 °C tagsüber und 20 °C nachts, eine Luftfeuchtigkeit von 70 % sowie eine Beleuchtungsstärke von 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Metallhalogendampflampen) bei einer Tageslänge (Photoperiode) von 16 Stunden (8,56 $\text{mol m}^{-2} \text{d}^{-1}$). Nach dem Priming (BBCH 12) wurden die Sämlinge in 10- oder 12-cm-Töpfe mit den Torfsubstraten „Floradur B“ (Floragard Vertriebs-GmbH, Saterland, DE) oder „ORANGE Topf“ (PATZER ERDEN GmbH, Sinntal-Altengronau, DE) pikiert und unter kontrollierten Bedingungen in Gewächshäusern (22 °C Tag, 18 °C Nacht) auf Anstautischen kultiviert. Während der Kultivierung auf Tischen wurden die Pflanzen nach Bedarf bewässert und gleichzeitig mit einer 0,5 % „Ferty 2 mega“-Düngerlösung (Hauert HBG Dünger AG, Grossaffoltern, CHE) gedüngt. Im Anschluss wurden die Tomatenjungpflanzen in Substratdämme (Einheitserde SP Topf grob, PATZER ERDEN GmbH, Sinntal-Altengronau, DE) verpflanzt. Die Experimente wurden in einer vollständig randomisierten Blockanlage mit 4 Blöcken und einer definierten Anzahl von Pflanzen pro Parzelle durchgeführt. Die inneren Pflanzen jeder Parzelle dienten als Versuchspflanzen, während die äußeren Pflanzen als Randpflanzen verwendet wurden, um Randeffekte von benachbarten Parzellen zu vermeiden. Während der Gewächshauskultivierung in Substratdämmen wurden die Pflanzen folgendermaßen fertigt: In den ersten zwei Wochen erhielten sie eine Lösung mit 0,122 g N $\text{m}^{-2} \text{d}^{-1}$ (FertyBasis1/ $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2/\text{NH}_4\text{NO}_3$) und 0,2 g $\text{K}_2\text{O m}^{-2} \text{d}^{-1}$, in den darauffolgenden zwei Wochen 0,244 g N $\text{m}^{-2} \text{d}^{-1}$ (FertyBasis1/ $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2/ \text{NH}_4\text{NO}_3$) und 0,4 g $\text{K}_2\text{O m}^{-2} \text{d}^{-1}$, und in den folgenden Wochen 0,366 g N $\text{m}^{-2} \text{d}^{-1}$ (FertyBasis1/ $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2/ \text{NH}_4\text{NO}_3$) und 0,6 g $\text{K}_2\text{O m}^{-2} \text{d}^{-1}$. Die Bewässerung wurde automatisch durch Tensiometer geregelt, abhängig vom Wasserbedarf der Kontrollgruppe. Salzstress wurde durch die Applikation von 100 mL 200 mM NaCl-Lösung (EC: 20 dS m^{-1}) pro Pflanze händisch verabreicht, wobei Kontrollpflanzen 100 mL destilliertes Wasser oder Regenwasser erhielten.

Messmethoden

In den Experimenten wurden verschiedene vegetative und generative Wachstumsparameter von Tomatenpflanzen erfasst, um deren Entwicklung und Ertrag unter verschiedenen experimentellen Bedingungen zu bewerten. Zu den vegetativen Wachstumsparametern gehörten die Pflanzenhöhe, die Internodienlänge, die relative Wachstumsrate (RGR), die anhand der Pflanzenhöhe berechnet wurde, sowie die Anzahl der Blätter (gemäß der BBCH-Skala für

Tomatenpflanzen). Die relative Wachstumsrate wurde wöchentlich mit der folgenden Formel berechnet: $RGR = (\ln H_2 - \ln H_1) / (t_2 - t_1)$, wobei H_1 und H_2 die Pflanzenhöhen zu den Zeitpunkten t_1 und t_2 darstellen. Die RGR wurde jedoch nicht eine Woche nach dem Umtopfen und Umpflanzen, da die Pflanzenhöhe in diesen Phasen zwischen den Pflanzen nicht vergleichbar war.

Zusätzlich wurden die Frischmasse (FM) und Trockenmasse (DM) der Pflanze am Ende der Experimente erfasst. Die generativen Parameter umfassten verschiedene Merkmale, die Aufschluss über die Ertragsleistung und die Stabilität der Ernteerträge der Tomatenpflanzen geben. Erfasst wurden dabei die Anzahl der Blütenstände und deren Abstand voneinander am Trieb sowie die Anzahl der Fruchtstände. Zusätzlich wurde die Anzahl vermarktbarer und nicht vermarktbarer Fruchtstände dokumentiert, wobei das Auftreten von Blütenendfäule als wesentlicher Qualitätsparameter in die Bewertung einfluss. Weitere Untersuchungen umfassten die Erfassung der Fruchterträge sowie das Gewicht der einzelnen Früchte. Reife Fruchtstände wurden zweimal pro Woche geerntet, sobald alle Früchte pro Fruchtstand sichtbar rot wurden. Die Früchte aus den frühen (dritten Fruchtstand), mittleren (fünften Fruchtstand) und späten (siebten Fruchtstand) Fruchtständen wurden mit einem Spektrophotometer (CM-700d, Konica Minolta, Business Solutions Europe GmbH, Langenhagen, DE) unter Berücksichtigung des Glanzes gemessen. Die L^* -, a^* - und b^* -Werte wurden dann zur Berechnung verschiedener Farbwerte (Hue, Farbindex, Farbdifferenz zu echtem Rot und a^*/b^* -Werte) verwendet.

Für die Blattanalyse wurden zu verschiedenen Zeitpunkten sowohl ontologisch junge (frisch gebildete, voll entwickelte) Blätter als auch das vorderste Spitzenblatt älterer Laubblätter nicht invasiv mit dem Dualex®-Messgerät (Dualex Scientific+™, Force-A, Orsay, FRA bzw. Pessl Instruments, Weiz, AUT) gemessen oder für nasschemische Laboranalysen entnommen. Die Blattfläche wurde von diesen Proben nach der Entnahme mit einem Blattflächenmessgerät LI-3100C, LI-COR Environmental, Lincoln, Nebraska, NE, USA) gemessen, um Rückschlüsse auf die Blattdicke zu führen. Anschließend wurde das Probenmaterial unmittelbar in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ im Gefrierschrank bis zur Analyse gelagert. Mit dem Dualex wurden Blatteinhaltsstoffe wie Chlorophyll (Chl), Flavonol (Flav) und Anthocyane (Anth) als dimensionslose Indizes gemessen. Darüber hinaus wurden verschiedene Inhaltsstoffe der Blätter und Früchte wie Gesamtchlorophyllgehalt (TCC), Gesamtcarotinoidgehalt (TCarC), Gesamtanthocyanengehalt (TAC), Gesamtphenolgehalt (TPC) und Flavonoidgehalte (FC) unter Verwendung eines Mikroplattenlesegeräts (Infinite M200, Tecan Group Ltd., Männedorf, CHE) sowie Gehalte von Ascorbinsäure, Brix und Gesamtsäure in Früchten analysiert. Die Flavonoidgehalte wurden in zwei Kategorien unterteilt: Flavonole und Flavone (Luteolin) sowie Rutin, Luteolin und Catechin, wobei die Ergebnisse in Äquivalenten von Quercetin (QEs) und Catechin (CEs) ausgedrückt wurden. Alle Proben wurden in drei technische Wiederholungen gemessen, um technische Fehler der Messgeräte zu minimieren. Eine detaillierte Beschreibung der Analysemethoden folgt im nachfolgenden Kapitel.

Zur Bestimmung der Stresszustand der Pflanzen wurden auch nicht invasiv die stomatale Leitfähigkeit von Wasserdampf (gsw) und die Elektronentransportrate (ETR) zur Bewertung des Pflanzenstresses durchgeführt. Dies wurde mit einem kombinierten Poro- und Fluorometer (LI-600, LI-COR Environmental, Lincoln, NE, USA) gemessen. Um den Einfluss von Behandlungen auf den physiologischen Zustand der Pflanzen zu bewerten, wurden außerdem hyperspektrale Analysen durchgeführt, die präzise Einblicke in den Stress- und Wasserstatus der

Tomatenpflanzen ermöglichten. Diese Analysen basierten auf der Berechnung mehrerer Vegetationsindizes (VIs), die mithilfe des ASD FieldSpec® 4 Standard-Res Spektroradiometers (Malvern Panalytical Ltd., Spectris, London, UK) erhoben wurden. Das Gerät deckt einen Messbereich von 350 bis 2500 nm ab und wurde eingesetzt, um an einem zentralen Punkt an der Blattspitze je eines ontologisch jungen und eines ausgewachsenen Blattes pro Pflanze die Reflexion einzelner Wellenlängen zu erfassen. Die Vegetationsindizes lieferten Informationen über die physiologische Anpassung und Stressreaktionen der Pflanzen und ergänzten damit die erhobenen morphologischen und Ertragsdaten.

Analysemethoden

Photometrische Bestimmung der Inhaltsstoffe

Methanolische Extraktion

Die Extraktion der Inhaltsstoffe der Blätter und Früchte erfolgte nach (Dörr et al. 2019). Für die Blattanalysen wurden etwa 10 mg gefriergetrocknetes und gemahlenes Probenmaterial in ein 2-mL-Reaktionsgefäß eingewogen und mit 2 mL $\geq 99,5$ % Methanol (reinst, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE) für zwei Tage bei 21 °C unter Ausschluss von Licht extrahiert. Für die Fruchtanalysen wurden 20 mg einer Mischprobe aus gefriergetrockneten und anschließend gemahlenen Früchten eines Trosses in 1 mL $\geq 99,5$ % Methanol extrahiert. Die Proben wurden anschließend für 90 Sekunden bei 13.000 rpm zentrifugiert und der Überstand in 2-mL-Reaktionsgefäße überführt. Die kolorimetrische Messung der Chlorophylle, Anthocyane, Carotinoide, Gesamtphenole und Flavonoide wurde bei stoffspezifischen Wellenlängen mit einem Mikroplattenlesegerät durchgeführt (Software Magellan Version 7.2, Tecan Group Ltd., Männedorf, CHE). Die Proben wurden unverdünnt mit dreifacher Wiederholung in klaren, 96er Zellkulturplatten mit Rundboden (Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, DE) gemessen. Als Kalibrierstandards wurden Verdünnungen der entsprechenden Referenzsubstanzen mit 12,5, 25, 50, 100 und 250 $\mu\text{L mL}^{-1}$ verwendet.

Chlorophylle und Carotinoide

Für die spektrophotometrische Bestimmung der Chlorophylle a und b (Chl_a und Chl_b) und Carotinoide (Car) wurden 100 μL der unverdünnten Blatt- bzw. Fruchtextrakte in dreifacher Wiederholung in die 96er Zellkulturplatten pipettiert und die Absorptionsmaxima mit den stoffspezifischen Wellenlängen in reinem Methanol nach (Lichtenthaler and Buschmann 2001) ermittelt. Diese liegen für Carotinoide (c_{x+c}) als Summe der Carotene (c_c) und Xanthophylle (c_x) bei 470 nm, für Chl_a (c_a) bei 665,2 nm und für Chl_b (c_b) bei 652,4 nm. Die Berechnung der Stoffkonzentrationen erfolgte mit den Absorptionswerten der spezifischen Wellenlängen (A) anhand folgender Formeln:

$$c_a \left[\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \right] = 16,72 A_{665,2} - 9,16 A_{652,4} \quad (1)$$

$$c_b \left[\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \right] = 34,09 A_{652,4} - 9,16 A_{665,2} \quad (2)$$

$$c_{(x+c)} \left[\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \right] = \frac{1000 A_{640} - 1,63 c_a - 104,96 c_b}{221} \quad (3)$$

Anthocyane (Cyanidin-3,5-O-diglucosid-Äquivalente)

Die Bestimmung der Anthocyane erfolgte im Anschluss an die Messung der Chlorophylle und Carotinoide nach Zugabe von 10 μL 10 %ige Salzsäure (HCl) in die Zellen bei der Wellenlänge

530 nm (Absorptionsmaximum für Anthocyane) und 657 nm (Absorptionsmaxima der Chlorophyllabbauprodukte). Die Anthocyane wurden anhand der Formeln von (Mancinelli 1990) berechnet, ausgedrückt als Cyanidin-3,5-O-diglucosid-Äquivalente:

$$A_{\text{Anthocyane}} = A_{530} - 0,25 A_{657} \quad (4)$$

Als Referenzstandard wurde Cyanidin (Cyanidin-3,5-O-diglucosid, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE) in den oben aufgeführten Verdünnungen verwendet.

Gesamtphenolgehalt (Gallsäure-Äquivalente)

Der Gesamtphenolgehalt wurde nach der Folin-Ciocalteu-Methode (FC) von (Singleton and Rossi 1965) bestimmt, die später von (Ainsworth and Gillespie 2007) an Mikroplattenlesegeräte angepasst wurde. In ein 2-mL-Reaktionsgefäß wurden 100 µL des Blatt- oder Fruchtextraktes überführt und mit 200 µL 10 % (v/v) Folin-Ciocalteus Phenolreagens (Merck KGaA, Darmstadt, DE) verdünnt mit zweifach entionisiertem Wasser. Nach 2 min wurden 800 µL 700 mM Na₂CO₃ (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE) zugegeben und gründlich gemischt und für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Proben wurden dann bei 13.000 rpm für 1 min zentrifugiert. Im nächsten Schritt wurden 200 µL in dreifacher Wiederholung in eine 96er Zellkulturplatte pipettiert und bei 765 nm im Mikroplattenlesegerät gemessen. Gallsäure (3,4,5-Trihydroxybenzoesäure) diente in den oben aufgeführten Verdünnungen als Referenzstandard (Merck KGaA, Darmstadt, DE). Die Ergebnisse wurden dargestellt als Gallsäure-Äquivalente.

Flavonoide (Quercetin-Äquivalente)

Der Flavonoidgehalt selektiv für Flavonole und Luteolin (FC_{Quercetin}) wurde bestimmt nach der Methode von (Ainsworth and Gillespie 2007), wie beschrieben in (Dörr et al. 2019). In ein 1,5-mL-Reaktionsgefäß wurden 100 µL des Frucht- oder Blattextraktes überführt und mit 300 µL ≥99,5 % Methanol (reinst, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE) und je 20 µL 10 % AlCl₃ (w/v) und 20 µL Natriumacetat (w/v) in wässriger Lösung (Merck KGaA, Darmstadt, DE) gemischt und mit 560 µL zweifach entionisiertem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 1000 µL aufgefüllt. Nach einer Inkubationszeit von 30 min wurden 200 µL in dreifacher Wiederholung in 96er Zellkulturplatten pipettiert und bei einer Wellenlänge von 415 nm gemessen. Als Referenzstandard wurde Quercetin ≥95 % (HPLC-Qualität, Merck KGaA, Darmstadt, DE) verwendet. Die Ergebnisse wurden als Quercetin-Äquivalente angegeben.

Flavonoide (Catechin-Äquivalente)

Der Flavonoidgehalt selektiv für Rutin, Luteolin und Catechin (FC_{Catechin}) wurde nach der Methode von (Eghdami and Sadeghi 2010) bestimmt, wie auch in (Dörr et al. 2019) beschrieben. In ein 1,5-mL-Reagenzgefäß wurden 100 µL der Frucht- bzw. Blattextrakte überführt und mit 300 µL zweifach entionisiertem Wasser und 30 µL 5% NaNO₂ versetzt. Nach 5 min Inkubationszeit wurden 30 µL 10 % AlCl₃ (w/v) zugegeben und gemischt. Nach weiteren 5 min Inkubationszeit wurden 200 µL 1 molare Natronlauge hinzugefügt und mit 340 µL zweifach entionisiertem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 1000 µL aufgefüllt. In dreifacher Wiederholung wurden 200 µL in 96er Zellkulturplatten pipettiert und bei 510 nm gemessen. Als Referenzstandard wurde (+)-Catechin ROTICHRON® (Carl Roth GmbH + Co. KG) verwendet. Die Ergebnisse wurden als Catechin-Äquivalente ausgegeben.

Gesamtheit der löslichen Stoffe und Gesamtsäure

Die titrierbare Gesamtsäure wurde bestimmt im Einklang mit den Untersuchungsverfahren nach §35 LMBG zur Bestimmung der titrierbaren Säure von Frucht- und Gemüsesäften (BVL 1997).

Die Gesamtheit der löslichen Stoffe (Brix) wurde ermittelt nach den Richtlinien zu objektiven Testmethoden zur Bestimmung der Qualität von Obst und Gemüse sowie Trocken- und getrockneten Erzeugnissen der Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung (OECD 2010). Insgesamt sechs Früchte eines Trosses wurden geerntet und geachtelt. Eine Mischprobe aus gleichen Anteilen wurde mit einem Handmixer homogenisiert und in flüssigem Stickstoff konserviert. Die Brix-Messungen wurden mit dem aufgetautem Fruchtpüree bei Raumtemperatur mit einem digitalen Refraktometer (ATAGO Digital Refraktometer PR-1, ATAGO Co., LTD, JPN) durchgeführt. Vom Fruchtpüree wurden zur Bestimmung der titrierbaren Gesamtsäure 50 g in ein 250 mL Becherglas überführt und mit 150 mL zweifach entionisiertem Wasser auf ein Gesamtgewicht von 200 g aufgefüllt und unter gelegentlichem Rühren für 60 min stehen gelassen. Die Proben wurden dann mit Spezialfiltern Typ 520b (Hahnemühle FineArt GmbH, Dassel, DE) filtriert. Anschließend wurden 50 g des Aliquots in ein 150-mL-Bechergläser eingewogen und mit zweifach entionisiertem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 120 mL aufgefüllt. Für die Titration wurde ein Metrohm 702 SM Titrino Titrator in Kombination mit dem Probenwechsler 730, einer Metrohm Elektrode Plus und der Software Tiamo 2.5 (Deutsche METROHM GmbH & Co. KG, Filderstadt, DE) verwendet. Titriert wurde mit 0,33 mol/L-0,33 N Natronlauge (Maßlösung, Carl Roth GmbH + Co. KG) bis pH = 8,1. Als Standard wurde 5 % Zitronensäure (wasserfrei, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE) verwendet. Die Menge der titrierbaren Gesamtsäure basierend auf Zitronensäureäquivalenten (CS) wurde errechnet mithilfe der folgenden Formeln:

$$CS \left[\frac{\text{mg}}{\text{g}} \right] = \frac{EP2 [\text{mL}] * 21,34}{\frac{\text{Probeneinwaage [g]} * \text{filtriertes Aliquot [g]}}{\text{Probeneinwaage [g]} + \text{Wasser [g]}}} \quad (5)$$

EP2 [mL] = Verbrauch [mL] von 1/3 N NaOH bis pH=8,1

Faktor für Zitronensäure = 21,34

Enzymatische Zucker- und Stärkebestimmung

Zuckerextraktion

Die photometrische Analyse von Glukose, Fruktose und Stärke erfolgte nach der Methodik von (Gomez et al. 2007) und (Zhao et al. 2010). Für die Zuckerextraktion wurden 10 mg gefriergetrocknetes und gemahlenes Fruchtmaterial in ein 2-mL-Reaktionsgefäß eingewogen und 1,5 mL 80 % Ethanol hinzugegeben, verdünnt von ≥99,5 %, reinst (Carl Roth GmbH + Co. KG). Die Proben wurde gemischt und bei 80 °C für 15 min in einem digitalen Trockenbad (Labnet International, Inc., Edison, USA) inkubiert. Anschließend wurde bei 7000 rpm für 5 min zentrifugiert und der Überstand in 15 mL PE-Röhrchen überführt. Die Extraktionsschritte wurden zweimal wiederholt, sodass eine Gesamtmenge von 4,5 mL Extrakt vorlag. Die Pellets wurden in einem digitalen Trockenbad bei 60 °C getrocknet für die Stärkeanalyse.

Puffer und Standards

Für die Analyse der Glukose, Fruktose- und Saccharosekonzentration wurden Standards mit bekannter Konzentration hergestellt. Für eine Stammlösung von 1 mg mL⁻¹ wurden 50 mg ≥99,5 % D(+)-Glucose-Monohydrat (Carl Roth GmbH + Co. KG) in 50 mL zweifach entionisiertem Wasser gelöst. Daraus wurden Verdünnungen mit den Konzentrationen 0.025, 0.05, 0.25, 0.5 und 1 mg mL⁻¹ hergestellt. Die photometrischen Messungen der Absorption von Glucose wurde bei

340 nm mit einem Mikroplattenlesegerät durchgeführt, gesteuert durch die Software Magellan Version 7.2 (Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz).

Zitratpuffer: Für 250 mL Puffer wurden 8,625 g $\geq 99,5\%$ Zitronensäure (wasserfrei, reinst) und 11,375 g $\geq 99\%$ tri-Natriumcitrat Dihydrat (Carl Roth GmbH + Co. KG) zweifach entionisiertem Wasser gelöst und mit 2 molarer Natronlauge auf pH = 4,6 eingestellt und anschließend bei 4 °C gelagert.

Tris-Puffer: Für 250 mL Tris-Puffer (Tris-(2-hydroxyethyl)-ammoniumchlorid) wurden 43,75 g $\geq 99\%$ Triethanolamin Hydrochlorid und 0,78 g $\geq 99\%$ Magnesiumsulfat Heptahydrat in zweifach entionisiertem Wasser gelöst und mit 5 molarer Natriumhydroxidlösung auf pH = 7,6 eingestellt und anschließend bei 4° C gelagert.

Tris-Kombi-Puffer: In einem 15 mL PE-Röhrchen wurden 100 mg $\geq 99,5\%$ Natriumhydrogenkarbonat, 100 mg Adenosin-5'-triphosphat Dinatriumsalz (ATP) und 20 mg $\geq 85\%$ β -Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat-Dinatriumsalz (NADP Dinatriumsalz) von Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, DE) eingewogen und in 10 mL Tris-Puffer gelöst.

Hexokinase/Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase (HK/G6P-DH): Es wurden 500 μ L Hexokinase/Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase (HK/G6P-DH) (Roche Pharma AG, Basel, Schweiz) in ein 2-mL-Reaktionsgefäß überführt und mit 500 μ L zweifach entionisiertem Wasser auf 1 mL Gesamtvolumen aufgefüllt.

Phosphoglucose isomerase (PGI): Für 1 mL Enzymlösung wurden 50 μ L Phosphoglucose Isomerase (PGI) (Roche Pharma AG, Basel, CHE) in ein 2-mL-Reaktionsgefäß überführt und mit 950 μ L zweifach entionisiertem Wasser aufgefüllt.

Invertase (β -fructosidase): In einem 2-mL-Reaktionsgefäß wurden 16 mg Invertase (Merck KGaA, Darmstadt, DE) eingewogen und mit 2-mL-Zitratpuffer durch mehrmaliges Invertieren gelöst.

Amyloglucosidase (AMG): In einem 2-mL-Reaktionsgefäß wurden 5,6 mg AMG eingewogen und in 2 mL Zitratpuffer gelöst. Tris-Kombi-Puffer und alle Enzymlösungen wurden am Tag des Gebrauchs frisch angesetzt.

Messung der Glukose- und Fruktosekonzentration

Für die Messungen wurden 96er Zellkulturplatten mit Rundboden (Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, DE) verwendet. Für jede Probe wurden 20 μ L des Zuckerextraktes in dreifacher Wiederholung in die Zellen pipettiert. In einem Trockenschrank bei 60 °C für 10 min wurden die Platten getrocknet, bis der Ethanol verdunstet war. Anschließend wurden die Proben mit 20 μ L zweifach entionisiertem Wasser durchmischt und die Standards und Blindproben in die vorgesehenen Zellen pipettiert. Die erste Messung für die Blindwerte wurde nach Zugabe von 100 μ L Tris-Kombi-Puffer bei 340 nm mit dem M200 Infinite Mikroplattenlesegerät durchgeführt, gesteuert durch die Software Magellan Version 7.2 (Tecan Group Ltd., Männedorf, CHE). Es wurden 10 μ L HK/G6P-DH in jede Zelle der Platte pipettiert und in einem neolab Thermomixer DTS-2 (neoLab Migge GmbH, Heidelberg, DE) bei 30 °C und 200 rpm für 30 min inkubiert. Die zweite Messung für Glukose wurde bei 340 nm durchgeführt, bevor 10 μ L PGI hinzugefügt und erneut bei 30 °C und 200 rpm für 30 min inkubiert wurde. Die dritte Messung zur Bestimmung der Fruktosekonzentration wurde ebenfalls bei 340 nm durchgeführt.

Die Zuckerkonzentration wurde mit der folgenden Formel errechnet:

$$\Delta \text{Gluc.}_{(\text{Proben/ Standard})} = \frac{((A_1 - A_2) - \text{Blindwert}_{\text{Absorption}}) \times \text{QUOTE} \times \text{Konstante} \times V}{\text{Wt. [g]}} * 100 \quad (6)$$

A_1, A_2 = Absorptionswerte der ersten und zweiten Messung

Konstante = Steigung der Kalibriergerade

V = Volumen des Zuckerextraktes

Wt. = Probeneinwaage [g]

Messung der Stärkekonzentration

Die getrockneten Pellets wurden mit 500 µl 0,5 molarer Natronlauge resuspendiert und gut durchmischt, bei 7000 rpm für 30 s zentrifugiert und bei 85 °C für 60 min im Trockenbad inkubiert. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurden 15 µl 100 % Essigsäure (Carl Roth GmbH + Co. KG) und 485 µl zweifach entionisiertes Wasser hinzugegeben und bei 5000 rpm für 5 min zentrifugiert. Die Proben, Standards und Blindproben wurden in dreifacher Wiederholung mit je 10 µl in 96er Zellkulturplatten mit Rundboden pipettiert. 20 µl AMG wurden hinzugegeben und bei 60 °C für 60 min inkubiert. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurden 100 µl Tris-Kombi-Puffer pipettiert und mit der ersten Messung die Blindwerte bestimmt. Nach Zugabe von 10 µl HK/G6P-DH wurden die Proben bei 30 °C und 200 rpm für 30 min inkubiert, bevor die zweite Messung für Glukose bei 340 nm durchgeführt wurde. Für die Berechnung wurde die obige Formel verwendet.

Ascorbinsäurebestimmung

Die Ascorbinsäure wurde potentiometrisch bestimmt nach einer abgeänderten Methode von (Tanner and Brunner 1987) und (Abe-Matsumoto et al. 2020). Etwa 100 g einer Mischprobe aus Früchten eines einzelnen Trosses wurden in eine 500 mL Polyethylen-Weithalsflasche (PE-Flasche) eingewogen und mit 200 g 1 % (w/v) wässriger Oxalsäure (Oxalsäure-Dihydrat, ≥99,5 %, Carl Roth GmbH + Co. KG) bei -20 °C konserviert. Die nicht vollständig aufgetauten Proben wurden mit einem handelsüblichen Stabmixer püriert und bei 15 °C für 12 min zentrifugiert. Es wurden 25 mL Aliquot in ein 150 mL Becherglas überführt und mit 15 mL 10 % Schwefelsäure (reinst, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE) und einer Spatelspitze ≥99,5 % Kaliumjodid (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE) versetzt. Alle Proben wurden in Doppelbestimmung mit Jodid-Jodatlösung 1/128 mol I₂/L - 1/64 N Maßlösung (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE) titriert. Verwendet wurde ein Metrohm 702 SM Titrino Titrator in Kombination mit dem Probenwechsler 730 und einer Doppelplatinelektrode (Deutsche METROHM GmbH & Co. KG, Filderstadt, DE). Als Standard wurden 100 mg ± 0,1 mg ≥99 % L(+)-Ascorbinsäure (L-AA) (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE) in 1 % (w/v) wässriger Oxalsäure gelöst (Zielkonzentration: 1 mg mL⁻¹). Die Ergebnisse wurden mit folgenden Formeln berechnet und in mg kg⁻¹ ausgegeben:

$$\text{ASC} \left[\frac{\text{mg}}{\text{L}} \right] = \frac{(c_{(I_2)} * M(L-AA) * 1000 * V_{(I_2)})}{V_{(\text{Aliq.})}} \quad (7)$$

$$\text{Massefaktor} = \frac{m_{(\text{Frucht})}[\text{g}] + m_{(\text{Oxalsäure})}[\text{g}]}{m_{(\text{Frucht})}[\text{g}]} \quad (8)$$

$$\text{ASC} \left[\frac{\text{mg}}{\text{kg}} \right] = \text{ASC} \left[\frac{\text{mg}}{\text{L}} \right] * \text{Massefaktor} \quad (9)$$

Statistische Datenanalyse

Die statistischen Analysen der Hauptversuche wurden in R (Version 4.2.2) und wie folgt durchgeführt. Die Datenanalyse der Vor- und Nebenversuche ist separat beschrieben. Zur Untersuchung signifikanter Unterschiede zwischen Behandlungen wurde ein lineares gemischtes Modell (lmer, lmerTest-Paket, Version 3.1.3) verwendet, das auf einem ANOVA-Typ-3-Test basierte ($\alpha = 0,05$; car-Paket, Version 3.1.1). Die post-hoc-Analyse erfolgte über geschätzte marginale Mittel (EMMs, $\alpha = 0,05$, Tukey-korrigiert; emmeans-Paket, Version 1.8.4.1) und die cld-Funktion (multcomp-Paket, Version 1.4.23), um Buchstaben zu erzeugen, die signifikante Unterschiede in paarweisen Vergleichen anzeigen.

Die lmer-Modelle wurden entsprechend der gemessenen Parameter spezifiziert: Für Blattparameter wurden das Blattalter und der Messzeitpunkt als Zufallsvariablen berücksichtigt, während bei Fruchtparametern das Erntestadium als Zufallsvariable und die Fruchtfärbung als Kovariablen dienten. Weitere zufällige Effekte wie die vollständig randomisierten Blöcke und verbundene Messwiederholungen wurden ebenfalls einbezogen. Zur Auswahl des besten Modells für Fruchtparameter wurde ein Modellvergleich verschiedener Farbindizes mit dem performance-Paket (Version 0.10.2) durchgeführt. Dabei wurden spezifische Farbindizes (z. B. Farbunterschiede zu echtem Rot) für die einzelnen Fruchtparameter berücksichtigt.

Vor der Durchführung der Analysen wurden Ausreißer in den Datensätzen (z. B. Dualex-Indizes, kolorimetrische Messungen, hyperspektrale Vegetationsindizes, Blatt- und Fruchthaltsstoffe) mit der Interquartilsbereichs-Methode identifiziert und entfernt, um Verzerrungen zu vermeiden.

Die multiple Faktorenanalyse (MFA, factoextra-Paket, Version 1.0.7) wurde auf standardisierte quantitative Variablen angewendet. Für Blätter wurden zwei separate MFAs durchgeführt: Eine umfasste primäre und sekundäre Blattsubstanzen, die andere hyperspektrale Vegetationsindizes. Bei Fruchtparametern wurden Primär- und Sekundärmetabolite (z. B. TCarC, TAC, TPC und FCs), Brix-Werte und titrierbare Säure als Eingangsvariablen verwendet. Die Behandlung wurde als aktive Variable definiert, während ergänzende Variablen wie das Blattalter, der Messzeitpunkt, die Fruchtfärbung (Hue, Farbindex, Farbunterschiede zu echtem Rot, a^*/b^*) und das Erntestadium (früh, mittel, spät) einbezogen wurden.

Grafische Darstellungen wurden mit dem ggplot2-Paket (Version 3.4.1) erstellt

Versuchsbeschreibung der Experimente

Tabelle 3.3.1: Chronologische Reihenfolge der Hauptexperimente (E), Nebenexperimente (N) und Vorversuche (V).

- V1 Hitze-Priming in Kombination mit Hitze-Folgestress
- E1 Hitze-Priming und Benzothiadiazol in Kombination mit Salzstress
- E2 Dauer von Hitze-Priming -Behandlung
- N1 Hitze-Priming in Kombination mit Hitze-Folgestress (Satz 1)
- E3 Hitze-Priming in Kombination mit zweimaligem Salzstress
- E4 Salz-Priming in Kombination mit verschiedenen Folgestress (var. M82)
- N2 Hitze-Priming in Kombination mit Hitze-Folgestress (Satz 2)
- E5 Hitze-Priming in Kombination mit einmaligem und kontinuierlichem Salzstress
- E6 Hitze-Priming in Kombination mit Salz-Folgestress (var. M82)
- E7 Sortenversuch zu Hitze-Priming und zweimaligem Salz-Folgestress
- E8 Demonstrationsversuch an der LWK NRW Versuchszentrum Straelen

Vorversuch zu Hitze-Priming in Kombination mit verschiedenen Folgestressen

Vorversuch 1: Hitze-Priming in Kombination mit Hitze-Folgestress

Versuchszeitraum: September bis Dezember 2021

Zur Untersuchung der Stresstoleranz von Tomatenpflanzen wurde ein Vorversuch durchgeführt, um die Wirkung von Hitze-Priming bei einem nachfolgenden Hitzestress zu erfassen. Das Experiment wurde mit der Tomaten-Hybridsorte var. Brio (Rijk Zwaan Welver GmbH, DE) durchgeführt. Die Samen wurden in Torfsubstrat (Floradur A) in Multitopfpfplatten ausgesät und für 14 Tage in Klimakammern bis zum BBCH-Stadium 12 kultiviert. In den Klimakammern wurden die Temperaturen tagsüber auf 22 °C und nachts auf 20 °C eingestellt. Die Luftfeuchtigkeit wurde auf einen Sollwert von 90 % eingestellt. Die Beleuchtungsstärke betrug $180 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Metallhalogendampflampen) bei einer Tageslänge von 12 Stunden. Kontrollpflanzen wurden durchgehend bei 22 °C gehalten, während geprimte Pflanzen täglich für 1,5 Stunden einem Temperaturanstieg auf 40 °C ausgesetzt wurden, der innerhalb von 30 Minuten erreicht und anschließend wieder auf 22 °C abgesenkt wurde. Nach dem Topfen (14 DAS) wurden die Pflanzen für weitere 18 Tage (bis 35 DAS, BBCH 16-17, Feller et al. 1995) im Gewächshaus kultiviert.

Anschließend (bis 49 DAS) wurde ein Hitzefolgestress in Klimaschränken mit 32 junge Pflanzen (16 geprimt, 16 ungeprimt) durchgeführt, die unter Einbezug von Kontrollpflanzen in vier Varianten (Priming/Kein Priming $\times$ Hitze/Keine Hitze) unterteilt wurden. Die Klimaschränke boten Platz für jeweils acht Pflanzen, die randomisiert angeordnet wurden. Aufgrund der begrenzten Kapazität gab es keine Randpflanzen. Die Bedingungen des Hitzefolgestresses entsprachen denen der Priming-Phase. Die Bewässerung erfolgte täglich nach Bedarf mit einer Nährlösung. Während der ersten 18 Tage wurden die Pflanzen mit einer 0,5 %igen Nährstofflösung (Ferty 2 mega) versorgt. Nach der Rückkehr in die Klimakammern (35 DAS) wurde die Nährlösungskonzentration auf 1 % erhöht. Das Pflanzenwachstum wurde wöchentlich durch Höhenmessungen dokumentiert. Biomasse und Blattfläche wurden am letzten Erntetag, 35 Tage nach dem Priming (49 DAS), gemessen. Ältere Blätter, die dem Priming ausgesetzt waren, und junge Blätter, die während des Hitzestresses gebildet wurden, wurden geerntet und photometrisch auf Inhaltsstoffe analysiert. Statistische Analysen wurden mit R durchgeführt. Die Chlorophyll- und Anthocyangehalte alter und junger Blätter wurde mittels ANOVA ($\alpha = 0,05$; post-hoc Fisher-LSD-Test) ausgewertet. Relative Wachstumsraten und Frischgewicht der Pflanzen wurden mit einem nicht-parametrischen Kruskal-Wallis-Test ($\alpha = 0,05$) und einem Bonferroni-Test post-hoc ($\alpha = 0,05$) analysiert.

Hauptexperimente

Experiment 1: Hitze-Priming und Benzothiadiazol in Kombination mit Salzstress

Versuchszeitraum: 14. März bis 4. August 2022

Versuchsdauer: 20 Wochen

Versuchswiederholung: einmalig

Das erste Experiment wurde durchgeführt, um das Wachstum und die Ertragsleistung von Tomatenpflanzen nach einer Hitze-Priming - oder Benzothiadiazol (BTH)-Behandlung sowie anschließendem Salzstress zu bewerten. Neben dem Hitze-Priming (1 WAS) wurde BTH ($0,54 \text{ mg BTH mL}^{-1}$, 100 mL pro Pflanze) als zusätzliche Behandlung 37 Tage nach dem Priming (DAP) angewendet. Kontrollpflanzen erhielten 100 mL destilliertes Wasser. Nach der Anzucht in Multitopfpfplatten mit Torfsubstrat (Floradur A) wurden die Pflanzen in 10-cm-Töpfe mit Floradur B pikiert, 14 Tage lang im Gewächshaus kultiviert und anschließend in Substratdämme in sechs

Reihen verpflanzt. Die zwei äußeren Reihen dienten dabei als Rand, um störende Umfeldeinflüsse im Gewächshaus zu minimieren. Der Salzstress wurde einmalig 44 DAP in Kombination mit den zuvor geprimten oder BTH-behandelten Pflanzen angewendet. Jede Parzelle/Behandlung ($n = 6$) und Reihe/Block ($n = 4$) umfasste 14 Pflanzen. Im Laufe des Experiments reduzierte sich der Stichprobenumfang aufgrund wiederholter Probenahmen und Behandlungen, um den Einfluss von Störgrößen zu vermeiden. Die Stichprobengröße der Messungen verringerte sich dadurch von $n = 14$ Versuchspflanzen pro Block auf $n = 12$ am 21. April 2022, $n = 8$ nach der BTH-Behandlung und $n = 4$ nach dem Salzstress.

Experiment 2: Dauer von Hitze-Priming-Behandlung

Versuchszeitraum: 15. Juni bis 26. Oktober 2022

Versuchsdauer: 7 Wochen

Versuchswiederholung: dreifach

In diesem Experiment variierte die tägliche Behandlungsdauer des Hitze-Priming: 0 min (Kontrolle), 45 min, 90 min und 180 min. Die Tomatensamen wurden in Floradur A gesät. Nach dem Priming wurden die Pflanzen in 10-cm-Töpfe mit Floradur B pikiert und bei 18 °C tagsüber und 16 °C nachts im Gewächshaus auf drei Anstautischen kultiviert, wobei ein vollständig randomisiertes Blockdesign mit drei Blöcken verwendet wurde, um lokale Umweltbedingungen zu berücksichtigen. Der Stichprobenumfang verringerten sich wöchentlich aufgrund der Probenahmen bis zum Ende der Experimente. Zu Beginn waren jeweils 15 Versuchspflanzen je Behandlung auf jedem der drei Tische platziert. Jede Woche (5 Wochen für Satz 1 und 3 Wochen für Satz 2 und 3) wurden pro Tisch entweder 3 Pflanzen (Satz 1) oder 5 Pflanzen (Satz 2 und 3) aus jeder Behandlung entnommen ($n = 9$ –15 Pflanzen pro Behandlung und Tisch). Die Gesamtzahl der getopften Pflanzen pro Behandlung ($n = 45$) war in allen Versuchssätzen konstant.

Experiment 3: Hitze-Priming in Kombination mit zweimaligem Salzstress

Versuchszeitraum: 12. Februar bis 6. Juli 2023

Versuchsdauer: 20 Wochen

Versuchswiederholung: einmalig

Ein weiteres Experiment wurde durchgeführt, um das Wachstum und die Ertragsleistung von geprimten Tomatenpflanzen nach zweimaligem Salzstress zu bewerten. Salzstress wurde entweder einmalig (7 DAP) oder zweimalig (21 DAP) appliziert. Die Pflanzen wurden zunächst in das Torfsubstrat „ORANGE Pikier“ gesät. Nach dem Hitze-Priming wurden die Pflanzen in 10-cm-Töpfe mit dem Substrat „ORANGE Topf“ pikiert und für 22 Tage im Gewächshaus auf Anstautischen weiterkultiviert, bevor sie nach der letzten Salzbehandlung in Substratdämme verpflanzt wurden. Die Versuchsanlage umfasste randomisierte Blöcke mit acht Pflanzen pro Parzelle, wobei sechs Pflanzen pro Parzelle gemessen wurden.

Experiment 4: Salz-Priming in Kombination mit verschiedenen Folgestress (var. M82)

Versuchszeitraum: 6. Juni bis 17. Oktober 2023

Versuchsdauer: 15 Wochen

Versuchswiederholung: einmalig

Dieser Versuch zum Salz-Priming von Tomatenjungpflanzen der Sorte M82 wurde mit verschiedenen Folgestressen durchgeführt, um die langfristigen Auswirkungen von Salz-Priming in Kombination mit nachfolgendem Hitze-, Salz- und UV-B-Stress auf das Pflanzenwachstum und die Fruchtentwicklung zu untersuchen. Das Experiment folgte einem vollständig randomisierten

Blockdesign. Die Probenumfänge variierten je nach Parameter und lagen zwischen 2 und 4 Pflanzen pro Behandlung (insgesamt 8 Behandlungen) und Block (4 Blöcke), was einen Stichprobenumfang von 8 bis 16 Pflanzen pro Behandlung ergab. Das Salz-Priming wurde 26 Tage nach der Aussaat am Forschungszentrum Jülich durchgeführt, wo die Pflanzen in Klimakammern in Steinwollwürfeln mit Nährlösung kultiviert wurden. Während dieser Zeit wurden die Pflanzen über fünf Tage hinweg dem Salzstress ausgesetzt. Die Lufttemperatur in den Klimakammern betrug tagsüber 22 °C und nachts 18 °C bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 50 %. Die Pflanzen erhielten eine Lichtintensität von $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ bei einer 10-stündigen Photoperiode. Das Priming erfolgte mit einer 200 mM NaCl-Lösung, was eine elektrische Leitfähigkeit (EC) von 20 dS m^{-1} ergab. Etwa drei Wochen nach dem Priming wurde der Folgestress im Gewächshaus angewendet. Der Salzstress bestand aus zwei Dosen von jeweils 100 ml 200 mM NaCl (EC: 20 dS m^{-1}). Der Hitzestress wurde mit einer Temperatur von etwa 40 °C auf der Blattoberfläche durch den Einsatz eines Beleuchtungswagens mit Dunkelstrahlern induziert, während der UV-B-Stress mit einer Bestrahlung von $0,288 \pm 0,036 \text{ kJ m}^{-2}$ auf die oberen und unteren Blätter ausgeübt wurde. Sowohl der Hitzestress als auch der UV-B-Stress wurden ab dem 74. Tag nach der Aussaat für 5 Tage täglich in randomisierter Reihenfolge der Behandlungen und jeweils 60 Minuten angewendet. Nach der Anwendung des Stressfaktors erfolgte die weitere Kultivierung der Pflanzen im Gewächshaus für etwa 6 Wochen, um die Auswirkungen der Priming- und Stressbehandlungen auf das Wachstum und die Ertragsphysiologie der Pflanzen zu beobachten.

Experiment 5: Hitze-Priming in Kombination mit einmaligem und kontinuierlichem Salzstress

Versuchszeitraum: 15. Februar bis 11. Juli 2024

Versuchsdauer: 21 Wochen

Versuchswiederholung: einmalig

Ein weiteres langandauerndes Experiment wurde mit der Tomatensorte var. Adeleza F1 durchgeführt, um die physiologischen Reaktionen, das Wachstum und den Ertrag von geprimten Tomatenpflanzen in Kombination mit einem einmaligen Salzstress unter anhaltend salinen Bedingungen zu untersuchen. Die Sämlinge wurden in das Substrat „ORANGE Pikier“ ausgesät und wurden nach dem Priming in 12-cm-Töpfe mit dem Substrat „ORANGE Topf“ pikiert. Zwei Wochen nach dem Priming (BBCH 14) wurde eine Salzstressbehandlung mit 100 mL 200 mM NaCl-Lösung (oder Leitungswasser als Kontrolle) appliziert. Eine Woche (BBCH 15) später wurden die Pflanzen in Substratdämme verpflanzt (salines Substrat: $EC\ 3,99 \pm 0,08 \text{ dS m}^{-1}$; nicht salines Substrat: $EC\ 0,78 \pm 0,01 \text{ dS m}^{-1}$). Die Parzellen wurden in einem vollständig randomisierten Blockdesign mit vier Reihen/Blöcken und acht Pflanzen pro Parzelle/Behandlung angelegt. Von diesen acht Pflanzen wurden die vier mittleren Pflanzen für Messungen ausgewählt, während auf jeder Seite der Parzelle zwei Pflanzen als Randpflanzen ausgeschlossen wurden.

Experiment 6: Hitze-Priming in Kombination mit Salz-Folgestress (var. M82)

Versuchszeitraum: 07. Juni bis 02. Juli 2024 (Versuchsabbruch)

Versuchsdauer: 4 Wochen

Versuchswiederholung: einmalig

Im Vergleich zum Versuch im Jahr 2023 mit der Tomatensorte var. M82 wurden 2024 keine Pflanzen vom Forschungszentrum Jülich bezogen, sondern direkt an der Hochschule Geisenheim gezogen. Die Tomatensamen wurden in das Substrat „ORANGE Pikier“ gesät und nach dem Hitze-Priming in 11-cm-Töpfe mit dem Torfsubstrat „ORANGE Topf“ pikiert. Im weiteren Verlauf erfolgte die Kultivierung der Pflanzen in einem vollrandomisierten Blockdesign auf vier Anstautischen im Gewächshaus. Allerdings trat bei der Düngedosierung ein Fehler auf, wodurch die Pflanzen während der Kulturzeit überdüngt wurden. Dies führte zu Verbrennungen und Wachstumsstörungen, die so gravierend waren, dass das Experiment abgebrochen werden musste (siehe Bild). Anstelle dessen wurde ein parallel verlaufender Versuchssatz weitergeführt, um die Effekte von Hitze-Priming in Interaktion mit Salzstress auf verschiedene Tomatensorten und deren Extraktionsleistung zu beobachten (siehe Experiment 7).

Experiment 7: Sortenversuch zu Hitze-Priming und zweimaligem Salz-Folgestress

Versuchszeitraum: 17. April bis 02. August 2024

Versuchsdauer: 20 Wochen

Versuchswiederholung: dreifach

Drei aufeinanderfolgende Versuchswiederholungen wurden mit dem Ziel durchgeführt, die Wirkung von Hitze-Priming in Kombination mit zwei aufeinanderfolgenden Salzstressereignissen, die zwei und drei Wochen nach dem Priming appliziert wurden, auf fünf Tomatensorten zu untersuchen: Adeleza F1, Saint Anna F1, Goudski F1, Bronski F1 und Dunk F1. Jede Versuchswiederholung erstreckte sich über 44 Tage nach der Aussaat. Die Aussaat erfolgte in das Substrat „ORANGE Pikier“. Nach dem Priming (BBCH 12) wurden die Pflanzen in 12-cm-Töpfe mit dem Torfsubstrat „ORANGE Topf“ pikiert. Die Töpfe wurden auf Anstautischen in vier vollständig randomisierten Blöcken mit je drei Pflanzen pro Variante und Parzelle (n = 12 Pflanzen pro Variante) für 28 Tage aufgestellt. An jeder Seite der Tische wurden zusätzlich drei Randpflanzen platziert. Zwei und drei Wochen nach dem Priming (14 und 21 DAP) wurden die Pflanzen mit 100 mL 200 mM NaCl-Lösung gestresst oder mit 100 mL Regenwasser als Kontrolle behandelt. Die Wiederholungen fanden ohne Überschneidungen in den Gewächshauskulturperioden statt. Im dritten Versuch wurden die Pflanzen ab 34 DAS in Substratdämme verpflanzt, um die Kulturdauer zu verlängern und die Auswirkungen der Priming-Behandlung auf die Fruchtentwicklung zu untersuchen. Bis 44 DAS wurden alle Pflanzen in gleicher Weise behandelt. Der weiterführende Gewächshausversuch des dritten Satzes in Substratdämmen musste schließlich ebenfalls abgebrochen werden, da im Gewächshaus erhebliche Schäden durch den Schaderreger Tomatenminiermotte auftraten.

Experiment 8: Demonstrationsversuch an der LWK NRW Versuchszentrum Straelen

Der Demonstrationsversuch wurde am Versuchszentrum Gartenbau Straelen mit der Tomatensorte var. Adeleza F1 durchgeführt. Ziel der Untersuchung war es, den Einfluss von Salz- und Hitze-Priming auf den Frucht- und Biomasseertrag unter Normalbedingungen sowie unter Salz- oder Hitzestress zu analysieren.

Die Jungpflanzen wurden an zwei Standorten angezogen: an der Hochschule Geisenheim und am Forschungszentrum Jülich. In Geisenheim erfolgte ein Hitze-Priming, während in Jülich eine Salz-Priming-Behandlung durchgeführt wurde. Die Aussaat der Tomatenpflanzen in Jülich fand am 10. November 2023 statt, das Salz-Priming wurde dort am 12. Dezember 2023 abgeschlossen. In Geisenheim wurden die Pflanzen am 16. November 2023 ausgesät und eine Woche nach der Aussaat über einen Zeitraum von sieben Tagen täglich für 90 Minuten einer Hitzebehandlung bei 40 °C unterzogen. Zusätzlich wurden an beiden Standorten unbehandelte Kontrollpflanzen aufgezogen.

Die Lieferung der Jungpflanzen aus Geisenheim erfolgte am 1. Dezember 2023, ihre Verpflanzung in Steinwollmatten für die Hydrokultur am 5. Dezember 2023. Die Jungpflanzen aus Jülich wurden am 13. Dezember 2023 geliefert und bis zur Pflanzung in Matten im Gewächshaus kultiviert. Die Pflanzen wurden ab 2024 in zwei separaten Gewächshäusern kultiviert: In einem wurde ein Salz-Folgestress appliziert, im anderen ein Hitzestress. Die Versuchspflanzen wurden in Reihen gepflanzt, wobei jede Reihe aus zwei Steinwollmatten bestand. Die Versuchsvarianten wurden jeweils in einer vollständigen Reihe angebaut und randomisiert verteilt. Um Störgrößen zu minimieren und ein praxisnahes Bestandsklima zu schaffen, wurden Randpflanzen in den äußeren Reihen gesetzt, die nicht in die Versuchsauswertung einbezogen wurden.

Die Pflanzen standen auf 15 cm breiten und 10 cm hohen Steinwollmatten von Grodan (Master GT) mit einem Reihenabstand von 1,60 m und einem Pflanzabstand von 0,25 m innerhalb der Reihe. Die Kultur wurde im V-System mit einer Bestandesdichte von 2,5 Pflanzen pro m² in zwei Reihen geführt. Die Temperaturregelung erfolgte lichtabhängig: Tagsüber lag die Temperatur zwischen 18 und 21 °C, nachts zwischen 14 und 19 °C, mit einer Vornachtabsenkung um 4 °C. Die Bewässerung wurde mit EC-Werten von 2,5–3,5 im Gießwasser und etwa 4 EC im Substrat bei einem pH-Wert von 5,5–6,5 durchgeführt. Der Energieschirm wurde bei einer Differenz von 8 °C zum Heizungssollwert geschlossen und morgens lichtabhängig geöffnet. Zur biologischen Schädlingskontrolle wurden gezielt Nützlinge eingesetzt, darunter *Encarsia formosa* und *Macrolophus* gegen die Weiße Fliege sowie *Dacnusa sibirica* und *Diglyphus isaea* gegen Minierfliegen. Die Lüftung wurde lichtabhängig im Temperaturbereich von 20 bis 24 °C reguliert. Der Folgestress wurde nach der Etablierung der Pflanzen appliziert. Der Salzstress begann in der 16. Kalenderwoche, sobald der erste Fruchtstand geerntet wurde, mit einer maximalen Leitfähigkeit von 20 mS cm⁻² in der Steinwollmatte. Der Hitzestress wurde in einem separaten Gewächshaus durch kontrolliertes Schließen der Lüftung während der Sommermonate induziert, um eine gezielte Temperaturerhöhung zu erreichen. Die Untersuchung der Pflanzen sowie die Erhebung der Messparameter erfolgten an markierten Individuen bis zum Kulturende.

Nebenexperimente

Nebenexperiment 1: Hitze-Priming in Kombination mit Hitze-Folgestress (Satz 1)

Versuchszeitraum: 03. November bis 15. Dezember 2022

Versuchsdauer: 6 Wochen

Versuchswiederholung: einmalig

Im Rahmen des Moduls „Intensivproduktion im geschützten Anbau“ im Masterstudiengang „Spezielle Pflanzen- und Gartenbauwissenschaften“ an der Hochschule Geisenheim wurde ein kurzzeitiger Versuch durchgeführt, um die physiologischen und morphologischen Auswirkungen eines Folgestresses in Form von Hitze auf zuvor thermogeprimte Pflanzen zu untersuchen. Hierfür wurden Tomatenpflanzen var. Adeleza F1 in Klimakammern im Torfsubstrat (Floradur A) ausgesät und nach dem Hitze-Priming (zwei Wochen nach der Aussaat) in 14-cm-Töpfe mit Floradur B umgepflanzt. Die weitere Kultivierung erfolgte im Gewächshaus auf vier Anstautischen (Blöcken) in einer vollständig randomisierten Blockanlage mit jeweils vier Varianten (Hitze-Priming /Kein Hitze-Priming × Hitze/Keine Hitze), wobei pro Variante 32 Versuchspflanzen exklusive Randpflanzen eingesetzt wurden. In den darauffolgenden zwei Wochen wurden wöchentlich jeweils acht Pflanzen pro Variante für nasschemische Laboranalysen entnommen, wodurch sich der Stichprobenumfang pro Variante nach jeder Probennahme um acht Pflanzen verringerte. Vier Wochen nach der Aussaat wurden die verbliebenen zwölf Versuchspflanzen pro Variante erneut in die Klimakammern überführt, um einem Folgestress ausgesetzt zu werden. Jede Variante wurde in einer separaten Klimakammer entweder Hitzestress (entsprechend den Bedingungen des Hitze-Primings) oder Kontrollbedingungen unterzogen. Im Anschluss wurden pro Variante sechs Pflanzen für weitere Analysen entnommen, während die übrigen sechs Versuchspflanzen für eine weitere Woche im Gewächshaus auf einem Anstautisch kultiviert wurden. Während des Versuchs wurden verschiedene Parameter erhoben, darunter Pflanzenhöhe, Blattanzahl, Entwicklungsstadium (BBCH-Stadium), Frischmasse, Trockenmasse, Blattfläche, spezifisches Blattgewicht sowie Blattinhaltsstoffe wie Chlorophyll-, Flavonol- und Anthocyan-Indizes, gemessen mit einem Dualex-Messgerät. Darüber hinaus wurden der Chlorophyll-, Carotinoid-, Gesamtphenol-, Flavonoid- und Anthocyan Gehalt in den Tomatenblättern mittels Photospektrometrie analysiert.

Die Berechnungen und Diagramme wurden mit Microsoft Excel (Version 2010) erstellt, während die statistischen Analysen mit SAS On Demand for Academics unter Anwendung einer ANOVA mit Dunnett-Post-hoc-Test ($\alpha = 0,05$) durchgeführt wurden. Ausreißer wurden mittels Bonferroni-Korrektur angepasst.

Nebenexperiment 2: Hitze-Priming in Kombination mit Hitze-Folgestress (Satz 2)

Versuchszeitraum: 02. November bis 14. Dezember 2023

Versuchsdauer: 6 Wochen

Versuchswiederholung: einmalig

Im Jahr 2023 wurde der vorausgehende Versuch im Rahmen des Moduls „Intensivproduktion im geschützten Anbau“ im Masterstudiengang „Spezielle Pflanzen- und Gartenbauwissenschaften“ an der Hochschule Geisenheim erneut durchgeführt. Ziel des Experiments war es, die physiologischen und morphologischen Auswirkungen eines Folgestresses durch Hitze auf zuvor thermogeprimte Tomatenpflanzen var. Adeleza F1 zu untersuchen. Die Pflanzen wurden in Klimakammern auf einem Torfsubstrat (ORANGE Pikier) ausgesät und nach dem Hitze-Priming, das zwei Wochen nach der Aussaat durchgeführt wurde, in 14-cm-Töpfe mit ORANGE Topfsubstrat umgetopft. Die weitere Kultivierung erfolgte, analog zum vorherigen Versuch, im

Gewächshaus sowie in Klimakammern. Dort wurden die Pflanzen auf vier Anstautischen (Blöcken) in einer vollständig randomisierten Blockanlage angeordnet. Der Versuchsaufbau umfasste vier Behandlungsvarianten, die sich aus der Kombination von Hitze-Priming (ja/nein) und Folgestress durch Hitze (ja/nein) ergaben. Der Hitzestress wurde in Klimakammern simuliert. Insgesamt wurden 32 Versuchspflanzen (exklusive Randpflanzen) je Variante im Gewächshaus kultiviert. Die Anzahl der Versuchspflanzen nahm im Verlauf des Versuchs durch die wöchentlichen Probenahmen ab.

Die statistische Analyse wurde mit R (Version 4.2.2) durchgeführt. Nach der Prüfung auf Normalverteilung (qq-Plot) und Varianzhomogenität (Levene-Test) wurden lineare gemischte Modelle für die ANOVA ($\alpha = 0,05$) verwendet. Die Post-hoc-Analyse erfolgte mit geschätzten marginalen Mittelwerten und einer Tukey-Anpassung ($\alpha = 0,05$).

3.4. Material und Methoden in Arbeitspaket 3: Priming und Priming-Effekte während der Fruchtproduktion (Universität Bonn, 2819NA115)

Entscheidungsanalyse für die Tomatenproduktion

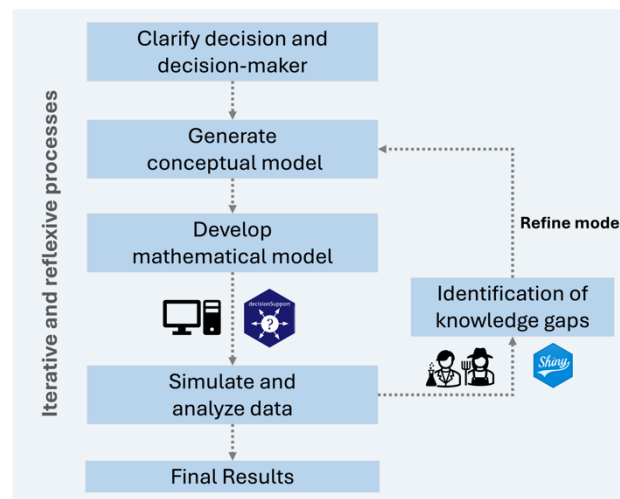


Abbildung 3.4.1: Der methodische Rahmen der Entscheidungsanalyse für die Tomatenproduktion mit Priming.

In den Arbeitspaketen AP3.5 und AP3.6 wird die Tomatenproduktion mit Priming entscheidungsanalytisch untersucht und modelliert (Abb. 3.4.1). Der Prozess beginnt mit der Definition des Entscheidungskontextes und der Identifizierung des Entscheidungsträgers. Darauf folgt die Entwicklung eines konzeptionellen Modells, das als Grundlage für die Konstruktion eines mathematischen Modells dient. Simulationen und Datenanalysen werden durchgeführt, um die Endergebnisse zu generieren, unterstützt durch iterative und reflexive Schritte, um Wissenslücken zu identifizieren, das Modell zu verfeinern und das Verständnis zu verbessern. Das Modell wurde parametrisiert und die Simulationen wurden mit dem *decisionSupport*-Paket in R durchgeführt (Luedeling et al. 2024). Das probabilistische Modell berücksichtigte drei Priming-Optionen – kein Priming, Heat-Priming und Salt-Priming – unter drei Bedingungen: kein Stress, Hitzestress und Salzstress (Tabelle 3.4.1). Nicht geprimte Behandlungen dienten als Kontrollgruppe unter unterschiedlichen Stressbedingungen und boten eine Ausgangsbasis für den Vergleich mit hitze- und salzgeprimten Behandlungen. In unserem probabilistischen Modell haben Landwirte als Entscheidungsträger die Option, in ihren Produktionssystemen in Nordrhein-

Westfalen (NRW) geprimte oder nicht-geprimte Tomaten anzubauen. Während die Landwirte nicht über die vorherrschenden Umweltbedingungen entscheiden können, erfüllt die Einbeziehung dieser in das Modell einen wichtigen Zweck. Insbesondere ermöglicht es uns, den potenziellen Einfluss von geprimten und später gestressten Pflanzen (wie sie im Labor beobachtet werden) auf das ökonomische probabilistische Modell zu bewerten. Die Ergebnisse dieser Simulationen sollen unseren Projektpartnern, darunter das Forschungszentrum Jülich, die Hochschule Geisenheim und die Universität Bayreuth, darüber informieren, welche Auswirkungen diese Laborergebnisse auf reale landwirtschaftliche Szenarien haben.

Tabelle 3.4.1: Entscheidungsoptionen unter verschiedenen Stressbedingungen.

Entscheidungsmöglichkeiten	Behandlung von Stress
No priming (Kontrolle)	Kein Stress (Kontrolle)
	Hitze stress
	Salz stress
Heat Priming	Kein Stress (Kontrolle)
	Hitze stress
	Salz stress
Salt Priming	Kein Stress (Kontrolle)
	Hitze stress
	Salz stress

Konzeptionelles Modell

Die ersten konzeptionellen Modelle zu ökonomischen und ökologischen Aspekten wurden auf der Grundlage einer Literaturrecherche entwickelt und anschließend anhand von Daten aus Experteninterviews mit Landwirten und Forschern verfeinert.

Datensammlung

Die Daten zu neun verschiedenen Behandlungen, an denen jeweils ca. 38 Tomatenpflanzen in der Produktionssaison 2024 beteiligt sind, stammen aus Experimenten, die von der Landwirtschaftskammer Nordrhein-Westfalen in Straelen durchgeführt wurden. In diesen Experimenten wurde die Tomatenproduktion mit vorbereiteten Setzlingen untersucht, die vom Forschungszentrum Jülich und der Hochschule Geisenheim zur Verfügung gestellt wurden.

Die in den Modellen verwendeten Daten wurden durch eine Kombination aus einer Literaturrecherche und qualitativen und quantitativen Interviews mit Landwirten gewonnen, wobei jedes Interview zwischen einer und zwei Stunden dauerte.

Probabilistisches Modell und Sensitivitätsanalyse

Die Ertragsangaben wurden pro Quadratmeter standardisiert. Aus diesen Daten wurde der Variationskoeffizient berechnet und ein 95%-Konfidenzintervall für die Ausführung des probabilistischen Modells festgelegt.

Das Entscheidungsmodell quantifizierte die wirtschaftlichen Ergebnisse jeder Option durch Berechnung des 5-Jahres-Kapitalwerts (NPV). Die finanzielle Leistung wurde auf der Grundlage des Nettonutzens pro Quadratmeter verglichen, der durch Abzug der Kosten vom Umsatz ermittelt wurde. Die zur Quantifizierung des Kapitalwerts verwendete mathematische Formel lautet wie folgt (r: Abzinsungssatz, t: Zeitpunkt der Simulation):

$$NPV = \sum_{t=1}^5 \frac{\text{Cashflow}_t}{[1 + r]^t}$$

Um die Bandbreite der möglichen NPVs für alle Priming-Optionen unter verschiedenen Stressbedingungen zu simulieren, nutzen wir ein Verfahren der probabilistischen Simulation, die Monte-Carlo-Simulation. Hierbei werden anhand von 10.000 Simulationsläufen NPV-Verteilungen generiert, indem zufällig Stichproben aus den, den Eingabevariablen zugeteilten Wahrscheinlichkeitsverteilungen gezogen werden. Diese Werte werden anschließend in das Entscheidungsmodell eingespeist.

Eine Sensitivitätsanalyse wurde durchgeführt, um Schlüsselvariablen zu identifizieren, deren verringerte Unsicherheit die Wirksamkeit der Entscheidungsfindung erhöhen könnte. Insbesondere wurde die Regression der Projektion auf latente Strukturen (PLS) eingesetzt, um die wichtigsten unsicheren Eingangsvariablen zu ermitteln, die die Variation des Kapitalwerts (NPV) beeinflussen.

VIP-Werte (Variable Importance in Projection) und Regressionskoeffizienten wurden verwendet, um die Relevanz und den Einfluss jede Prädiktorvariable auf die Modellausgabe zu bewerten (Luedeling and Gassner 2012). Die VIP-Scores wurden aus einer PLS abgeleitet und geben den relativen Beitrag der einzelnen Ertragskomponenten zur prognostizierten NPV an. Nach festgelegten Schwellenwerten wurde davon ausgegangen, dass Variablen mit einem VIP-Score von mehr als 1 einen signifikanten Einfluss auf das Modell haben (Chong and Jun 2005; Wold et al. 1993). Zusätzlich wurde die Richtung der Korrelation zwischen den einzelnen Variablen und der NPV-Differenz mit Hilfe von Regressionskoeffizienten bewertet, wobei zwischen positiven und negativen Assoziationen unterschieden wurde.

Darüber hinaus wurde eine Value-of-Information-Analyse (VoI) implementiert, bei der der Expected Value of Perfect Information (EVPI) als primäres Instrument verwendet wurde, um festzustellen, ob die Erfassung zusätzlicher Daten zu diesen Schlüsselvariablen die Unsicherheit effektiv reduzieren und folglich den Entscheidungsprozess verbessern kann. EVPI quantifiziert den Gewinn des Erwartungswerts, wenn eine Entscheidung mit perfekten statt mit aktuellen unvollkommenen Informationen getroffen wird (Hubbard DW 2014). Unter Verwendung des *evpi-Pakets* in R (Kopton 2024) wurde die EVPI auf der Grundlage der resultierenden Werte mit der folgenden Formel geschätzt:

$$EVPI = EV_{withPI} - \max(EMV)$$

Optimal Priming, eine interaktive Applikation

Angesichts der zeitlichen Zwänge, die durch die saisonale Natur der Tomatenproduktion auferlegt wurden, erwies sich die Organisation eines groß angelegten partizipativen Workshops als nicht durchführbar. Um diese logistische Herausforderung zu bewältigen und sowohl die Verwaltung des quantitativen Fragebogens als auch die Verbreitung von Informationen zur Entscheidungsanalyse zu erleichtern, wurde eine interaktive Applikation, "Optimal Priming", entwickelt. Die Anwendung "Optimal Priming", die mit dem "shiny"-Paket (Chang et al. 2024) in R konstruiert wurde, basiert auf unserem probabilistischen Modell.

3.5. Material und Methoden in Arbeitspaket 4: Molekulare Bestimmung des Primings (Helmholtz Zentrum München, IFE, 2819NA116)

Pflanzenmaterial

Das Pflanzenmaterial für die epigenetischen Untersuchungen des Primings wurden von den Partnern 1 und 5 zur Verfügung gestellt. Im Einzelnen handelte es sich dabei um Blattproben aus vier verschiedenen Versuchsansätzen, die entsprechend für die Methodenetablierung (AP4.2), die Genom-weiten Untersuchungen der Histon- und DNA-Methylierungsmuster nach Priming in M82 (AP4.4) und die Übertragung der Ergebnisse auf Adeleza (AP4.5) verwendet wurden. Für AP4.2 wurden die Pflanzen von Partner 5 auf Erde angezogen und entsprechend der Methodenbeschreibung Salz-geprimt oder Kontroll-behandelt; für AP4.4 wurden M82 Proben von Partner 1 und 5 verwendet, die Anzucht und Behandlung der Pflanzen erfolgte auf Steinwolle, wie in den entsprechenden Methodenteilen beschrieben; für AP4.5 wurden Adeleza Jungpflanzen-Proben von Partner 1 verwendet.

Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP)

Das ChIP-Protokoll basierte auf vorherigen Studien (Liu et al. 2018) und wurde auf das verwendete Probenmaterial angepasst. Für die ChIP wurden junge Blattgewebeproben von *S. lycopersicum* cv. M82 (AP4.4) oder Adeleza (AP4.5) verwendet. Diese wurden aufgeteilt in Kontrollproben (wasserbehandelt) und salzbehandelte Proben. Es wurde jeweils drei biologische Replikate durchgeführt und 3 g Blattgewebe pro Replikat verwendet.

Das Gewebe wurde mit einem Pistill in einem Mörser mit flüssigem Stickstoff zu feinem Pulver vermahlen. Das Pulver wurde in 20 mL Zellkern-Isolierungspuffer 1 (50 mM HEPES pH 8.0, 1 M Saccharose, 5 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 0.05% (v:v) Triton® X 100 (10%), ddH₂O, 5 mM β-Merkaptoethanol (1/3,000), 0.25 mM PMSF (1/200), 2.5 mM Benzamidine (1/200) und EDTA-freie Protease Inhibitoren (Merck)) resuspendiert. Die Suspension wurde durch ein Miracloth filtriert. Anschließend wurde der Extrakt mit 1,25 mL frischem 16%igen Formaldehyd (Endkonzentration 1%) für 5 Minuten bei Raumtemperatur fixiert und die Fixierung mit 1,3 mL Glycin gestoppt. Danach wurden 0,5 mL 10% Triton® X-100 zugegeben und die Proben für 5 Minuten bei 4 °C rotiert. Die Suspension wurde durch ein 40 µm Zellsieb filtriert und bei 3.000 x g, 4°C für 20 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 10 mL Extraktionspuffer 2 (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.25 M Saccharose, 10 mM MgCl₂, 1%(v:v) Triton® X 100 (25%), ddH₂O, 5 mM β-Merkaptoethanol (1/3,000), 0.2 mM PMSF (1/500), 2.5 mM Benzamidine (1/200) und EDTA-freie Protease Inhibitoren (Merck)) resuspendiert. Das resuspendierte Pellet wurde bei 8.000 x g für 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde wieder verworfen und das Pellet erneut in 10 mL Extraktionspuffer 2 resuspendiert und unter denselben Bedingungen zentrifugiert. Das Pellet wurde dann in 2 mL Extraktionspuffer 3 (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1.7 M Sucrose, 2 mM MgCl₂, 0.15% (v:v) Triton® X 100 (10%), ddH₂O, 5 mM β-Merkaptoethanol (1/3,000), 0.2 mM PMSF (1/500), 2.5 mM Benzamidine (1/200) und EDTA-freie Protease Inhibitoren (Merck)) resuspendiert, auf 2 mL Extraktionspuffer 3 geschichtet und anschließend 1 Stunde bei 16.000 x g und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 400 µL Zellkernlysepuffer (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA, 0.8% (w:v) SDS, ddH₂O, 1.4 mM β-Merkaptoethanol (1/10,000), 0.2 mM PMSF (1/500), 2.5 mM Benzamidine (1/200) und EDTA-freie Protease Inhibitoren (Merck)) resuspendiert und bei 4 °C für 30 Minuten rotiert. Anschließend wurden 4 Volumina ChIP-Verdünnungspuffer (1.1% (v:v) Triton® X 100 (25%), 1.1 mM EDTA, 16.7 mM Tris-HCl pH 8.0, 167 mM NaCl (5 M), ddH₂O, 0.2 mM PMSF

(1/500), 2.5 mM Benzamidine (1/200) und EDTA-freie Protease Inhibitoren (Merck)) hinzugefügt und der Inhalt gleichmäßig auf vier Röhrchen für die Zerkleinerung mit der Qsonica-Apparatur verteilt. Der Sonikator wurde auf 16 Zyklen eingestellt, je 20 Sekunden Puls, gefolgt von 40 Sekunden Kühlzeit, bei 80% Amplitude und 4°C. Danach wurden die Inhalte der vier Röhrchen in ein neues 2-mL-Eppendorf-Röhrchen überführt. Jedem Röhrchen wurden 1 mL ChIP-Verdünnungspuffer (1x Volumen) hinzugefügt und der Inhalt bei 16.000 x g bei 4°C für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde in neue Röhrchen überführt und der Schritt wiederholt. Die Überstände wurden in frische 2-mL-Röhrchen überführt, mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70 °C für die Immunpräzipitation gelagert. Für die Shearing-Kontrolle/Inputs wurden 300 µL entnommen und mit 200 µL ChIP-Verdünnungspuffer auf 500 µL verdünnt. 3,5 µL NaCl (5 M) wurden zugegeben und 10 Minuten bei 95°C inkubiert, um die DNA-Protein-Quervernetzung aufzuheben. 20 µL 0,25 M EDTA, 16,75 µL 1 M Tris-HCl (pH 7,0) und 2 µL RNase A (10 mg/mL) wurden zugegeben und der Inhalt bei 40 °C für 30 Minuten inkubiert. Anschließend wurden 542 µL Phenol/Chloroform/IAA zugegeben, kräftig geschüttelt und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, gefolgt von Zentrifugation bei 12.000 x g, bei 16 °C, 15 Minuten lang. Der wässrige Überstand (~400 µL) wurde in neue Röhrchen überführt. DNA wurde mit 1 µL Glykogen, 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat und 0,8 Volumen 100% Isopropanol für 30 Minuten bei Raumtemperatur gefällt und anschließend bei voller Geschwindigkeit und 4 °C für 30 Minuten zentrifugiert. Die DNA-Pellets wurden mit 1 mL kaltem 75% Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert, unter dem Abzug getrocknet und in 20 µL EB bei 65°C für 15 Minuten gelöst.

Eingefrorene Proben wurden aufgetaut und Protein A/G-Lösung (Thermo) nach Anleitung vorbereitet. Je 25 µL Protein A/G-Lösung wurden in 12 Röhrchen gegeben, zu denen je 1–1,2 mL Überstand kam, und die Proben wurden bei 4 °C für 1 Stunde unter Rotation vorgeklärt. Dann wurden je 4 µL der primären Antikörper gegen H3K4me3 (Merck, LOT: 4103062), H3K27me3 (abcam, ab6002, LOT: 1035698) oder H3 (abcam, ab1791, LOT: GR3426007-1) zugegeben und die Proben über Nacht bei 4 °C rotiert. Danach wurden 30 µL Protein A/G Dynabeads hinzugefügt und 2 Stunden bei 4°C inkubiert. Waschen erfolgte dreimal mit Niedrigsalzpuffer (50 mM NaCl, 0.1% (w:v) SDS, 1% (v:v) Triton® X 100 (10%), 2 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl pH 8.0 und ddH₂O), einmal mit Hochsalzpuffer (500 mM NaCl, 0.1% (w:v) SDS, 1% (v:v) Triton® X 100 (10%), 2 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl pH 8.0 und ddH₂O), einmal mit LiCl-Puffer (0.25 M LiCl, 1% (v:v) NP-40, 1% C24H40O4 neat, 1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl pH 8.0 und ddH₂O), und zweimal mit TE-Puffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1.1 mM EDTA und ddH₂O). Elution der DNA erfolgte zweimal mit je 150 µL Elutionspuffer (1% (w:v) SDS, 0.1 M NaHCO₃ (Sigma-Aldrich) und ddH₂O) für 15 Minuten bei 65 °C und einer nachfolgenden Zentrifugation bei 1.000 RPM. Die Eluate wurden gepoolt, 12 µL 5 M NaCl zugegeben (Endkonz. 200 mM), und über Nacht bei 65 °C de-fixiert. Anschließend wurden zu jeder Probe 12 µL 0,25 M EDTA, 10 µL 1 M Tris-HCl (pH 7,0) und 2 µL RNase A zugegeben und die Ansätze bei 40 °C für 30 Minuten inkubiert. Dann erfolgte die Zugabe von 2 µL Proteinase K (20 mg/mL) und Inkubation bei 50 °C für 1 Stunde. Dann erfolgte die Extraktion mit Phenol/Chloroform/IAA und Zentrifugation bei 12.000 x g für 20 Minuten. Die DNA wurde durch Zugabe von Glykogen, Natriumacetat und Ethanol gefällt, bei -20 °C 2 Stunden inkubiert, zentrifugiert, gewaschen und in 15 µL EB bei 65 °C gelöst.

Zur Quantifizierung der DNA wurde der Qubit™ Fluorometer (Invitrogen™, Katalog #: Q32851) mit dem dsDNA High Sensitivity Kit verwendet. Arbeitslösung (1:200) und zwei Standards wurden vorbereitet. Jeweils 2 µL DNA wurden mit 198 µL Arbeitslösung gemischt, 2 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und mit dem Gerät gemessen.

DNA-Isolation für Bisulfitsequenzierung und KEASP-Assay

Als Ausgangsmaterial diente junges Blattgewebe von *Solanum lycopersicum* und *Arabidopsis thaliana*, aufgeteilt in Kontroll- und salzbehandelte bzw. Wildtyp und Mutanten-Proben. Die DNA-Isolierung erfolgte mit dem DNeasy® Plant Mini-Kit (Qiagen) nach den Herstellerangaben. 100 µg Gewebe wurde mit flüssigem Stickstoff gemahlen und in ein neues Röhrchen überführt. Nach Verdampfen des Stickstoffs wurden 400 µL Puffer AP1 zugegeben, Mischung bei 65°C für 30 Sekunden inkubiert. Nach weiteren Schritten mit RNase A, Puffer P3 und Zentrifugation wurde der Überstand (Lysat) mit Puffer AW1 (1,5x Volumen) gemischt, auf eine DNeasy Mini Spin-Säule gegeben, gewaschen (AW2), getrocknet, und die DNA mit 70 µL AE-Puffer eluiert. Die DNA-Proben wurden bei -20 °C für die WGBS-Bibliotheksherstellung aufbewahrt.

Bisulfitkonvertierung der DNA für die Bestimmung der DNA-Methylierung

Die Bisulfitbehandlung wurde mit dem EpiTect® Bisulfite Kit (Qiagen, Lot: 172030123) durchgeführt. Dazu wurde ein Reaktionsansatz aus 20 µL DNA, 85 µL Bisulfite-Mix und 35 µL DNA-Protektionspuffer hergestellt. Die Konvertierung erfolgte in einem Thermocycler mit folgendem Temperaturprogramm: zunächst Denaturierung bei 95 °C für 5 Minuten, gefolgt von einer Inkubation bei 60 °C für 25 Minuten, einer weiteren Denaturierung bei 95 °C für 5 Minuten, anschließend einer Inkubation bei 60 °C für 85 Minuten, einer dritten Denaturierung bei 95 °C für 5 Minuten, einer längeren Inkubation bei 60 °C für 175 Minuten und schließlich einem Halteschritt bei 20 °C für unbestimmte Zeit. Anschließend wurden 310 µL Buffer BL, gemischt mit Carrier-RNA, zur Probe gegeben. Die Lösung wurde 15 Sekunden lang pulsartig gevortext, kurz zentrifugiert und auf eine Spin-Säule übertragen. Die Säulen wurden bei 16.000 x g für 1 Minute zentrifugiert; der Durchfluss wurde verworfen. Die Spin-Säulen wurden mit Buffer BW, anschließend mit Buffer BD, und abschließend nochmals mit Buffer BW gewaschen, jeweils durch Zentrifugation bei 16.000 x g für 2 Minuten. Die DNA wurde schließlich in 25 µL Elutionspuffer EB eluiert und bei 16.000 x g für 1 Minute zentrifugiert. Die Elution wurde wiederholt, und 20 µL der finalen Elution wurden in einen frischen 8-Röhrchen-Streifen überführt.

Detektion differentieller DNA-Methylierung mittels kompetitiver Epi-Allel-spezifischer PCR (KEASP)

Der KASP™-Assay (Kompetitive Allel-spezifische PCR, LGC Biosearch Technologies) ist eine molekularbiologische Methode zur Detektion von Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNPs), sowie anderen genetischen Variationen (Semagn et al. 2014). Diese Technik basiert auf fluoreszenzbasierter FRET-Technologie (Fluoreszenzresonanzenergietransfer) und verwendet allele-spezifische Primer, die Fluoreszenzsignale erzeugen, welche jeweils einem bestimmten Allel zugeordnet sind. Die Methode zeichnet sich durch hohe Spezifität, Sensitivität sowie Kosteneffizienz aus und wird sowohl in der Pflanzenforschung als auch in der Diagnostik (z. B. Nachweis von Arzneimittelresistenzen bei Krankheitserregern wie *Plasmodium falciparum*) verwendet (Alvarez-Fernandez et al. 2021). Aufgrund der hohen Skalierbarkeit eignet sich der KASP™-Assay sowohl für kleine als auch große Stichprobenumfänge (Dipta et al. 2024).

Das Design umfasst zwei kompetitive allele-spezifische Forward-Primer, einen universellen Reverse-Primer sowie zwei FRET-Kassetten mit Fluorophoren (FAM und HEX), die jeweils an Quencher gekoppelt sind. Die beiden Forward-Primer unterscheiden sich lediglich an der 3'-Position durch das jeweilige SNP-Basensignal. Zusätzlich tragen sie am 5'-Ende eine spezifische Fluoreszenzmarkierung (FAM bzw. HEX). Während der PCR-Amplifikation bindet jeweils nur der

Primer, der perfekt zur Zielsequenz passt. Nach erfolgter Elongation werden die allelspezifischen Sequenzen mit den FRET-Kassetten detektiert, was zur Emission eines allelspezifischen Fluoreszenzsignals führt. Homozygote Proben zeigen ein Fluoreszenzsignal, während heterozygote Proben beide Signale liefern. Die Genotypisierung erfolgt somit effizient und ohne Sequenzierung.

KASP™-basierter Assay zur Detektion von DNA-Methylierung

Wir haben den KASP™-Assay so angepasst, dass er auch zur Detektion differentieller DNA-Methylierung eingesetzt werden kann. Die Idee basiert auf der Bisulfit-Konvertierung, bei der nicht-methylierte Cytosine in Uracil umgewandelt werden, während methylierte Cytosine geschützt bleiben und ihre Sequenz beibehalten. Bei nachfolgender PCR-Amplifikation werden diese Uracile als Thymin interpretiert. Durch die gezielte Gestaltung allelspezifischer Primer, die entweder ein Cytosin (methylierte Variante) oder ein Thymin (nicht-methylierte Variante) an der SNP-Position enthalten, lassen sich die beiden Varianten im PCR-Ansatz unterscheiden. Fluoreszenzsignale der FRET-Kassetten (FAM oder HEX) ermöglichen die Detektion der Methylierungsstatus über die jeweilige Primerbindung.

Es ist dabei essenziell, dass nur die cytosinspezifische Position in den Primern die Methylierungsinformation trägt. Alle anderen Cytosine, sowohl im Primer als auch in der Zielsequenz (ausgenommen Fluoreszenzmarker), werden als nicht-methyliert behandelt und dementsprechend konvertiert. Diese Basen erscheinen nach der PCR als Thymin. Zudem ist der Einsatz einer uracil-insensitiven DNA-Polymerase unerlässlich, um die bisulfitbehandelte DNA effizient amplifizieren zu können. Diese Technik soll eine zuverlässige Unterscheidung von methylierter und unmethylierter DNA ohne aufwendige Sequenzierungsverfahren ermöglichen.

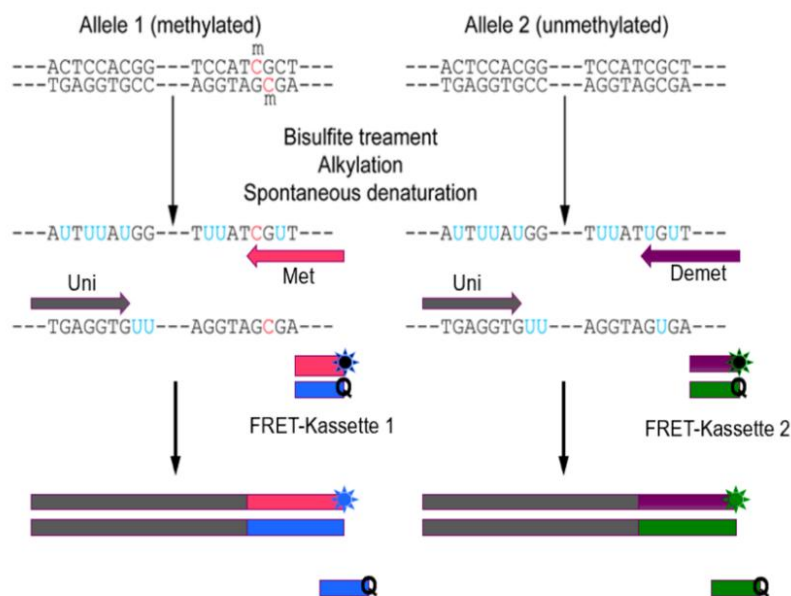


Abbildung 3.5.1: Schematische Darstellung des KEASP-Assays zur Detektion differentieller DNA-Methylierung. Allel 1 enthält ein methyliertes Cytosin, das während der Bisulfitbehandlung geschützt bleibt und somit seine ursprüngliche Sequenz beibehält. Im Gegensatz dazu enthält Allel 2 ein nicht-methyliertes Cytosin, das durch die Bisulfitbehandlung in Uracil umgewandelt wird, was die Zielsequenz verändert. Die Anwesenheit von methylierten bzw. nicht-methylierten DNA-Abschnitten wird durch die kompetitive Bindung der entsprechenden allelspezifischen Forward-Primer bestimmt. Jede Primer-Variante ist mit einer eigenen FRET-Kassette gekoppelt, wodurch distinkte Fluoreszenzsignale entstehen, die eine eindeutige Unterscheidung der beiden Allele ermöglichen.

Primerdesign

Die Anwendung des KEASP-Assays zur Detektion von DNA-Methylierung erforderte eine Anpassung des Primerdesigns, insbesondere unter Berücksichtigung der durch Bisulfit-Konvertierung veränderten DNA-Sequenz. Nach der Behandlung werden nicht-methylierte Cytosine in Uracil umgewandelt, was zu einer signifikanten Veränderung der Sequenz führt und ein gezieltes Primerdesign notwendig macht. Um eine effiziente Allelspezifität zu gewährleisten, wurden Primer mit einem Fokus auf methylierte Cytosine am oder nahe dem 3'-Ende entworfen. Basierend auf Sequenzierdaten wurden methylierte Regionen identifiziert, die zwischen Wildtyp- und Mutanten bzw. Kontroll- und Salz-behandelten Pflanzen differenziell methyliert waren. Für die Entwicklung des KEASP-Assays wurde DNA des Modelorganismus *Arabidopsis thaliana* verwendet, weil öffentliche Methylomdaten von Wildtyp und Mutantenlinien, die in der DNA-Methylierung gestört sind, verfügbar sind, was eine eindeutige Identifizierung von *bona fide* Epiallelen, d.h. differentiell methylierten Regionen, ermöglichte. Während im Wildtyp die Methylierung erhalten blieb, ging sie in der Mutante *methd1* infolge der Mutation verloren (siehe Abbildung 3.5.2).

Die Genomsequenzen wurden von TAIR (*Arabidopsis thaliana*) bzw. Ensembl Plants (*Solanum lycopersicum*) bezogen, wobei nicht-methylierte Cytosine in Uracil konvertiert wurden. Das Primerdesign erfolgte mithilfe des NCBI Primer Design Tools, wobei ausschließlich der obere DNA-Strang berücksichtigt wurde, da dieser für die Primerplanung ausreichend ist. Zur Unterscheidung zwischen methylierter und nicht-methylierter Allele wurden in die Primer für die methylierte Variante HEX-Oligos, für die nicht-methylierte Variante FAM-Oligos integriert. Aufgrund der reduzierten GC-Konzentration infolge der Bisulfit-Konversion (20–40 % statt 40–60 %) waren die Primer länger als bei klassischen KASP™-Assays (24–30 bp statt 18–25 bp).

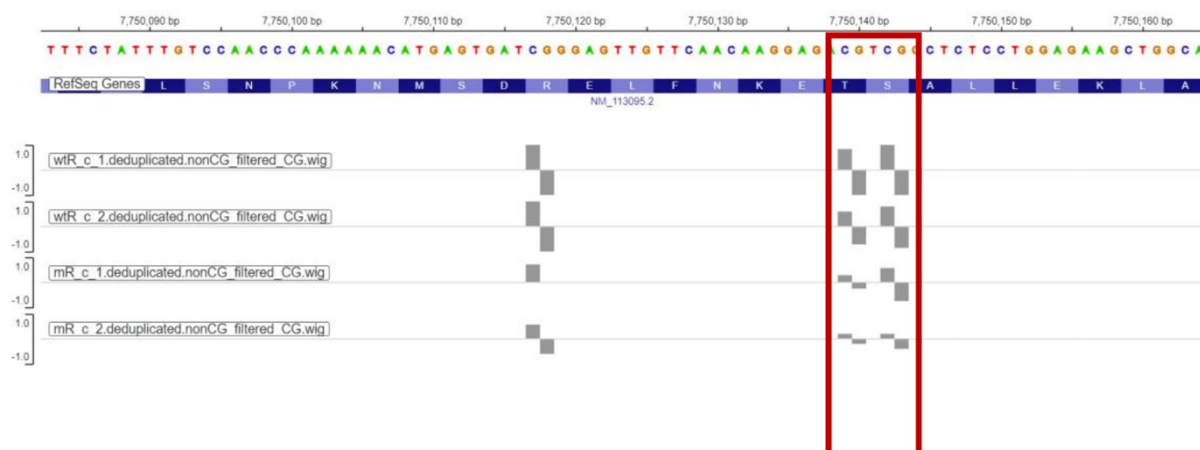


Abbildung 3.5.2: Differentiell-methylierte Region für das Primer-Design. Genome-Browser-Darstellungen für Wildtyp (wtR-c) und *methd1* Mutanten (mR-c) Proben (je 2 Replikate) zeigen CG-Methylierungsniveaus am differentiell methylierten Marker-Locus DUF26.

Temperaturgradient-PCR

Zur Bestimmung der optimalen Annealing-Temperaturen für die spezifischen Primer wurde eine Temperaturgradient-PCR mit 30–33 Zyklen im Temperaturbereich von 66 °C bis 52 °C durchgeführt (Tabelle 3.5.1). Die PCR-Reaktionen enthielten jeweils 2 µL 5× Q5 Reaktionspuffer (NEBNext®, #B9037SVIAL), 0,2 µL 10 mM dNTPs, 0,5 µL eines 5 mM Forward-Primers (entweder für die methylierte [m1H-HEX] oder unmethylierte [u1F-FAM] Variante), 1 µL 5 mM Reverse-Primer, 0,1 µL Q5U Hot Start High-Fidelity DNA-Polymerase (uracil-insensitiv; NEBNext®,

#M0515SVIAL), 4,7 µL PCR-geeignetes H₂O sowie 1 µL genomische DNA von *Arabidopsis* oder Tomate. Die Effizienz der Primer wurde nachfolgend durch Agarose-Gelelektrophorese bewertet. Hierbei wurden die PCR-Produkte auf einem 2 % Agarosegel bei 110 V für 25 Minuten aufgetrennt. Ein 100 bp DNA-Ladder (Thermo Scientific™ O'RangeRuler 100+500 bp, #SM0653) diente als molekularer Größenstandard. Die Intensität der Amplifikationsprodukte erlaubte Rückschlüsse auf die Effizienz der jeweiligen Primer unter den getesteten Bedingungen. Die Temperatur mit der höchsten Bandeffizienz im Gel wurde für die weiteren KEASP-Reaktionen verwendet.

Tabelle 3.5.1: Bedingungen für die Temperaturgradient-PCR

Schritt	Temperatur (°C)	Dauer	Zyklen
Initiale Denaturierung	98 °C	30 Sekunden	1
Denaturierung	98 °C	5 Sekunden	
Annealing (Gradient)	66 °C – 52 °C	20 Sekunden	30–33 Zyklen
Elongation	72 °C	20 Sekunden	
Finale Elongation	72 °C	2 Minuten	1
Halten	4 °C	unendlich	

KEASP-PCR-Optimierung

Da die Standard-KASP™-Mastermix-Polymerase (LGC Biosearch Technologies) keine uracil-haltigen Matrizen verarbeiten kann, wurde ein zweistufiges PCR-Verfahren etabliert. In einem ersten Schritt erfolgte eine Touchdown-PCR mit uracil-insensitiver Q5U-Polymerase (New England Biolabs) bei der zuvor ermittelten optimalen Annealing-Temperatur (Tabelle 3.5.2). Das so erzeugte uracilfreie Amplifikat diente im zweiten Schritt als Matrize für die KEASP-spezifische Detektion, welche mittels standardisierter PCR mit 28 Zyklen (Tabelle 3.5.3) durchgeführt wurde. Optional konnte ein Recycling-Zyklus (Tabelle 3.5.4) zur Erhöhung der Diskriminierung zwischen Allelen hinzugefügt werden.

Tabelle 3.5.2: Touchdown-PCR-Zyklen für uracil-insensitive Polymerase (Q5U)

Schritt	Temperatur (°C)	Dauer	Zyklen
Initiale Denaturierung	98 °C	30 Sekunden	1
Denaturierung	98 °C	5 Sekunden	
Annealing (Touchdown)	66 °C bis 58 °C*	20 Sekunden	17–12 Zyklen
Elongation	72 °C	20 Sekunden	
Finale Elongation	72 °C	2 Minuten	1
Halten	4 °C	unendlich (∞)	

*Temperaturabnahme um 0,5 °C pro Zyklus.

Tabelle 3.5.3: Zyklusbedingungen für die standardisierte KASP™-PCR

Phase	Schritt	Temperatur (°C)	Dauer	Zyklen
Phase 1	Aktivierung der Taq-Polymerase (Hot Start)	94 °C	15 Minuten	1
Phase 2	Denaturierung	94 °C	20 Sekunden	
	Annealing/Elongation	56 °C–58 °C	60 Sekunden	28–41 Zyklen
Phase 3	Plate Read (Messung)	30 °C	60 Sekunden	1

Tabelle 3.5.4: Zyklusbedingungen für das optionale KASP™-Recycling

Schritt	Temperatur (°C)	Dauer	Zyklen
1. Denaturierung	94 °C	5 Minuten	1
2. Denaturierung	94 °C	20 Sekunden	3 Zyklen
3. Annealing/Elongation	57 °C	60 Sekunden	
4. Plate Read	30 °C	1 Minute	1

KEASP-Kontrolle zur Genotypisierung

Zur Validierung der Effizienz der modifizierten Zwei-Stufen-PCR wurde eine Genotypisierungskontrolle eingeführt. Hierbei kamen spezifische Primer zur Detektion eines SNPs (G/A) im *mthfd1-1* Allel zum Einsatz (Tabelle 3.5.5). Das PCR-Protokoll sowie die Zyklusbedingungen entsprachen den Bedingungen in Tabellen 3.5.2–3.5.4).

Tabelle 3.5.5: Liste der Primer. Die FAM- (F) und HEX-Sequenzen (H) sind fett dargestellt, methylierte Cytosine (C) sind grün markiert, während nicht-methylierte Cytosine als Thymin (T) in rot dargestellt sind. Die SNPs der Genotypisierungskontrollprimer sind in orange und blau hervorgehoben.

Primer Name	Sequenz (5'-3')
DUF_Kasp_m1H	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTAGTTGTTTAATAAGGAGAC CGTC
DUF_Kasp_u1F	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTAGTTGTTTAATAAGGAGAT TGT
DUF_Kasp_rev	TTATTTACCATCACAACTCTAAAAA
SOK_Kasp_m1H	GAAGGTCGGAGTCAACGGATT CGTTATTT CGAGGTTTAGGGTTTC
SOK_Kasp_u1F	GAAGGTGACCAAGTTCATGCT TGTTATTT TGAGGTTTAGGGTTT
SOK_Kasp_Rev	AATTTCCAACAAACAATCAAAATCTCCC
1Hap2_Kasp_m1H	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTGATTAAAGGGAAGGTAAATAT TGC
Hap_2_Kasp_m1H	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTGATTAAAGGGAAGGTAAATAT CGC
Hap_2_Kasp_u1F	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGATTAAAGGGAAGGTAAATAT TGT
Hap_2_Kasp_rev	CTCAACTCACACACTAAATCCTAATAAC

m-Kasp-wt-FAM	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTACGAGCAGTTGTTGTAGGTC G
m-Kasp-m-HEX	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTACGAGCAGTTGTTGTAGGTCA A

Bisulfitesequenzierungs-Datenanalyse

Die Rohdaten (Reads) wurden zunächst mit Trimmomatic (Bolger et al. 2014b) und den Parametern ILLUMINACLIP:1:30:12:3:true, CROP:150 HEADCROP:4, LEADING:3, TRAILING:3, SLIDINGWINDOW:4:15 und MINLEN:20 vorverarbeitet. Anschließend erfolgte das Mapping der prozessierten Reads auf das M82-Referenzgenom mithilfe von Bismark (v0.23.1) (Krueger and Andrews 2011). Dabei wurde die Parameter N auf 1 und X auf 700 festgelegt. Duplizierte Reads wurden entfernt. Die Methylierungsraten wurden separat für CG-, CHG- und CHH-Stellen als Quotient aus $\#C/(\#C + \#T)$ berechnet. Tracks für den Genome-Browser, welche die CG-, CHG- und CHH-Methylierungsraten mit einer Einzel-Cytosin-Auflösung zeigen, wurden aus den Bismark-Output-Dateien (genomweite Cytosin-Methylierung) generiert, wobei nur Cytosin-Positionen mit mindestens 4 Reads berücksichtigt wurden.

Zur weiterführenden Analyse wurden die genomweiten Cytosin-Methylierungsdaten aus den Bismark-Output-Dateien in das R-Paket methylKit (v1.20.0) (Akalin et al. 2012) importiert. Cytosin-Stellen mit weniger als 4 Reads wurden von der Analyse ausgeschlossen. Chromosomale Methylierungsplots wurden erstellt, indem $\#C$ und $\#T$ in genomweiten 10-kb-Bins zusammengefasst wurden, wobei jeder Bin mindestens 10 abgedeckte Cytosin-Stellen aufweisen musste. Daraus wurden anschließend die CG-, CHG- und CHH-Methylierungsraten der zusammengefassten Replikate berechnet. Für Metaplots wurden alle transponierbaren Elemente (TEs) und Gene der TAIR10-Genomversion in jeweils 20 gleichgroße Abschnitte zwischen Start- und Stopp-Position sowie flankierende 1-kb-Regionen in 100-bp-Abschnitte eingeteilt. Differenziell methylierte Regionen (DMRs) wurden aus 200-bp-Bins mit einem $FDR \leq 0,01$ bestimmt, basierend auf einem logistischen Regressionstest mit SLIM-korrigierten p-Werten. Die minimale absolute Differenz der Methylierungsrate betrug 0,4 (CG), 0,3 (CHG) und 0,2 (CHH). Die Überlappungen der DMRs aus verschiedenen paarweisen Vergleichen wurden mit dem Tool Intervene visualisiert (Khan and Mathelier 2017). DMRs aller paarweisen Vergleiche mit der Kontrollgruppe wurden zusammengefasst, wobei Regionen, die weniger als 200 bp voneinander entfernt waren, für die Clusteranalyse und Heatmap-Darstellung mithilfe des R-Pakets pheatmap (Kolde 2019) zusammengeführt wurden.

ChIP-seq-Datenanalyse

Für die Analyse der ChIP-seq-Daten wurde die automatisierte Analysepipeline Nextflow nf-core/chipseq (Version 2.0.0) genutzt (Patel et al. 2024), wobei Singularity-Container auf dem Hochleistungsrechner-Cluster am Helmholtz Zentrum München verwendet wurden. Der Workflow begann mit der Qualitätskontrolle der Rohdaten (Reads) mittels FastQC. Anschließend wurden minderwertige Reads sowie Adaptersequenzen mit Trim Galore entfernt. Die verbleibenden Reads wurden mit dem Burrow-Wheeler Aligner für kurze Reads (bwa2) gegen das Referenzgenom von *S. lycopersicum* cv. M82 v1.3 (Alonge et al. 2019) kartiert.

Zur Identifikation der breiten („broad“) Peak-Regionen wurde der MACS2-Algorithmus („Model-based Analysis of ChIP-seq“, Version 2) verwendet. Anreicherungsdiagramme („Enrichment plots“) wurden mit deepTools (Version 3.5.2) erstellt (Ramírez et al. 2016). Die Analyse der Peak-

Belegung („Occupancy“) und der differentiellen Bindungsaffinität („Differential Binding Affinity“) erfolgte mit DiffBind (Version 3.10.0) (Ross-Innes et al. 2012). Zusätzlich kamen intern entwickelte Skripte zum Einsatz, um Peak-Profile detailliert zu untersuchen und funktionelle Anreicherungsanalysen mit dem R-Paket ChIPseeker (Version 1.36.0) durchzuführen (Yu et al. 2015).

4. Ausführliche Darstellung der wichtigsten Ergebnisse

4.1. Ergebnisse zu Arbeitspaket 1: Priming von Tomaten-Jungpflanzen gegen abiotischen Stress (Forschungszentrum Jülich, IBG-4, 2819NA061)

Mit Hilfe der bildbasierten Phänotypisierung und der daraus ermittelten Wachstumsraten konnten Stressreaktionen gut und empfindlich quantifiziert werden (Abb. 3.1.2). Die in der bildanalytischen bestimmte projizierte Blattfläche (PLA), die die Größe der Tomatenpflanze anzeigt, wurde zur Ermittlung der relativen Wuchsrates (RGR) genutzt. Nach Untersuchung verschiedener Primingstimuli (Hitze, Kälte, Salzstress) konnten wir einen effektiven positiven Primingeffect von Salzstress-Priming auf das relative Pflanzenwachstum (RGR) unter nachfolgend angewandtem Salzstress nachweisen (Abb. 4.1.1A, Tabelle 4.1.1.). Die Dauer der Erholung nach dem Priming konnte von zunächst 7 Tagen (nicht gezeigt) auf 10 Tage ausgedehnt werden, ohne eine Verringerung des verbesserten Wachstums bei nachfolgendem Salzstress zu verursachen. Ergebnisse zu den Wachstumsraten unter Salzstress nach Salz-Priming mit 10 Tagen Erholungszeit werden auch in der im Moment vorbereiteten Veröffentlichung Beier et al. (2025) gezeigt.

Das Projekt hat sich in vielen Arbeitspaketen auf Grund dieser Ergebnisse auf das Priming mit Salzstress fokussiert. Weiterhin wurde der Effekt des Thermoprimsings auf Keimlinge bei Partner 2 in AP2 auf späte Effekte im Gewächshaus untersucht.

Es konnten keine positiven Wachstumseffekte nach Priming von Jungpflanzen mit Kälte auf nachfolgendes Wachstum unter Kältestress oder nach Hitze-Priming auf nachfolgenden Hitzestress nach je 10 Tagen Erholungszeit gezeigt werden (Tabelle. 4.1.1).

Nach Etablierung des Salz-Primsings wurde versucht, den Primingeffect durch das Anwenden von wiederholtem Salzstress zu verstärken. In einem Wechsel von Salzstress und Kontrollbedingung ebenfalls 5 Tage lang wurde jeweils 24 Stunden in Salzstress kultiviert und anschließend das Salz ausgewaschen, sowie die Pflanzen 24 Stunden in normaler Hoagland-Nährlösung kultiviert. So wurde 3-mal einen Tag lang Salzstress appliziert, und 2-mal dazwischen eine eintägige Erholungsphase erlaubt. Dieser Versuch brachte keine Verstärkung des Primingeffectes mit sich (nicht gezeigt).

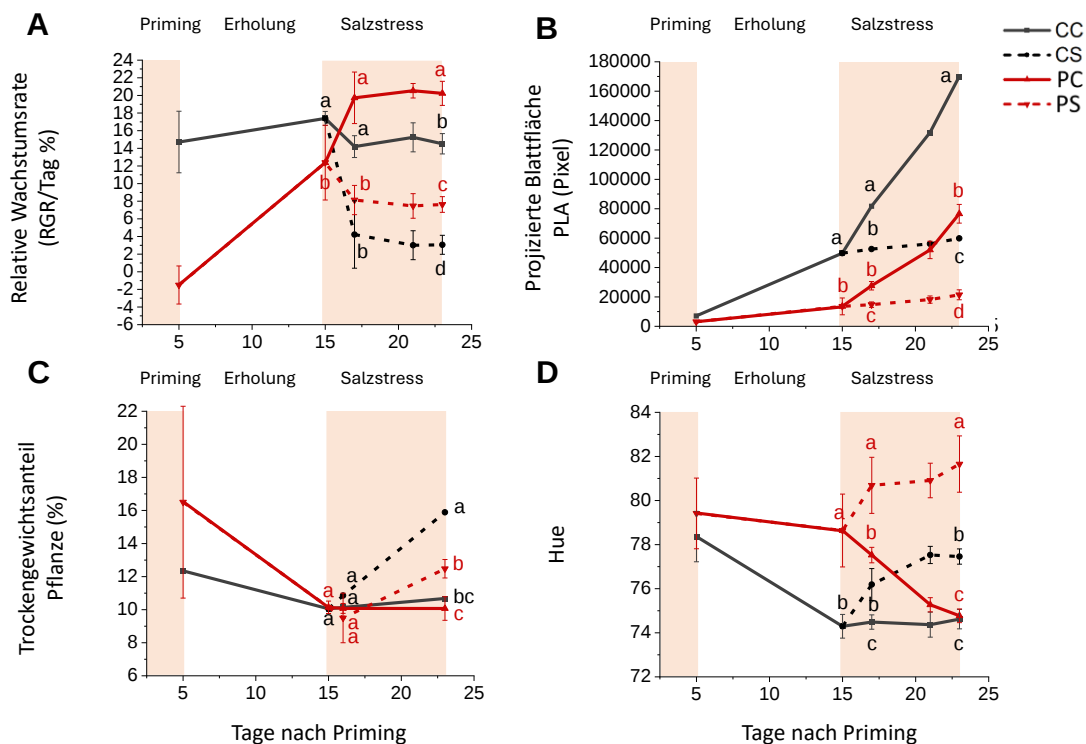


Abbildung 4.1.1: Salz-Priming verbessert das Wachstum von jungen Tomatenpflanzen (M82) bei nachfolgendem Salzstress. A: relative Wachstumsrate; B: projizierte Blattfläche (projected leaf area, PLA); C: Trockengewichtsanteil am Frischgewicht; D: Farbton Hue in Blättern junger Tomatenpflanzen. Gefärbte Bereiche zeigen Phasen der Salzbehandlung der entsprechenden Gruppen an. Die Linien zeigen den Mittelwert $\pm$ SD an. Unterschiedliche Buchstaben bezeichnen signifikante Unterschiede nach Post-hoc-Tukey-Test ($p < 0,05$; $n = 4$). CC: ungeprimte Kontrolle, CS: ungeprimte Pflanzen im Salzstress, PC: Salzgeprimte Kontrolle, PS: Salzgeprimte Pflanzen im Salzstress. Datenerhebung, -Analyse, und Darstellung: Sara Beier, Forschungszentrum Jülich.

Anders als die im Salzstress verbesserte relative Wuchsrate (RGR) reagierte die Größe der Pflanzen in der PLA negativ auf das Salz-Priming und nahm bei den geprimten Pflanzen stark ab. Dies zeigt, dass Priming zwar die RGR verbessern kann, aber zu einer Verringerung der Pflanzenbiomasse (auch in Frisch und Trockengewicht) führt (Abb. 4.1.1. B). So wäre ein längeres Wachstum geprimter Jung-Pflanzen nötig, um die Größe ungeprimter Jung-Pflanzen zu erreichen, ein Faktor, der in den Kosten der Jungpflanzen (4.4., Arbeitspaket 3) Berücksichtigung finden muss, da diese länger kultiviert werden müssen. Interessanterweise zeigte der Trockengewichtsanteil der Blätter, dass geprimte Pflanzen im Vergleich zu nicht geprimten Pflanzen unter Salzstress einen höheren Wassergehalt aufwiesen (Abb. 4.1.1.C), das zeigt eine bessere osmotische Regulation der geprimten Pflanzen unter Salzstress an. Der für die Pflanzenfarbe ermittelte Farbwert „hue“ steigerte sich durch Salzstress. Dieser Parameter war in geprimten Pflanzen auch nach der Erholung von 10 Tagen erhöht und wurde durch weiteren Salzstress weiter erhöht (Abb. 4.1.1D). Solche Indizes könnten genutzt werden, um den Primingstress zu quantifizieren und so zu dosieren und somit reproduzierbar und gleichmäßig anzuwenden, um konsistente Primingeffekte zu erzeugen.

Die Effektivität des Salzstress-Primings in der F1 Hybridsorte Adeleza konnte im Rahmen einer Bachelorarbeit und in einem weiteren Experiment bestätigt werden auch hier zeigte sich die Wachstums-fördernde Wirkung des Salz-Primings auf das Wachstum unter Salzstress nach

10 Tagen Erholung (Abb. 4.1.2.A). Auch in der Sorte Adeleza konnte, wie in M82, ein geringerer Wasserverlust in geprimten Pflanzen unter Salzstress beobachtet werden (Abb. 4.1.2.B).

Die Anschaffung eines „Dualex“-Leaf-Clip Systems ermöglicht die Erfassung von Fluoreszenzindexen, zur Quantifizierung des Salz-Primingstresses. Hier konnte für die Indexe FLAV repräsentativ für epidermale Flavonoide, ANTHO repräsentativ für epidermale Anthozyane und auch für einen Chlorophyllindex in der Sorte Adeleza signifikant veränderte Werte festgehalten werden, die aber im weiteren Verlauf an Deutlichkeit verloren (Bachelorarbeit L. Holz 2024, nicht gezeigt).

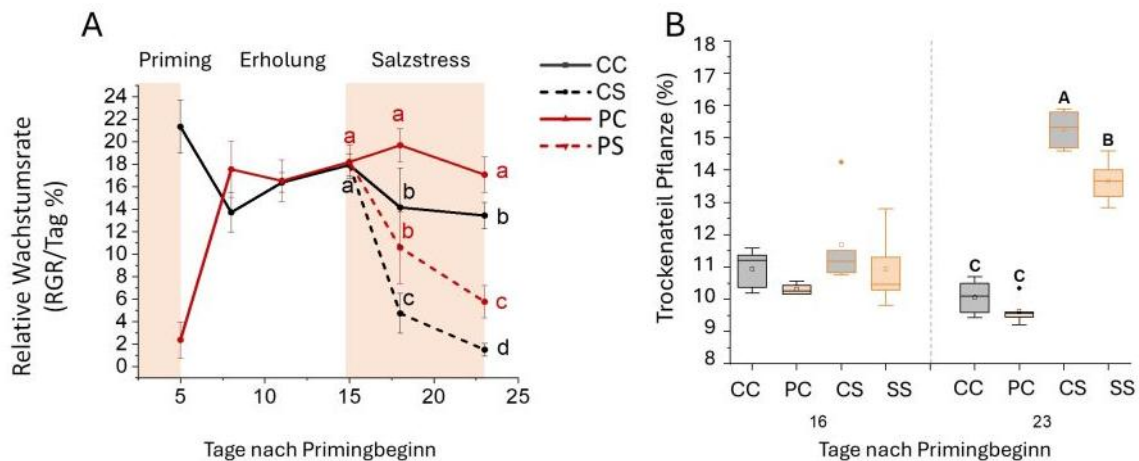


Abbildung 4.1.2: Salz-Priming verbessert das Wachstum von jungen Tomatenpflanzen (Adeleza) bei nachfolgendem Salzstress. A: relative Wachstumsrate von jungen Tomatenpflanzen (RGR) in % pro Tag. Die Linien geben den Mittelwert $\pm$ SD an. Gefärbte Bereiche zeigen Phasen der Salzbehandlung der entsprechenden Gruppen an. B: Box-Plot Darstellung des Trockengewichtsanteils 16 Tage nach Primingbeginn (1 Tag nach Salzstress), und 23 Tage nach Primingbeginn (nach 8 Tagen Salzstress). Unterschiedliche Buchstaben bezeichnen signifikante Unterschiede gemäß dem Post-hoc-Tukey-Test ($p < 0,05$; $n = 4$). CC: ungeprimte Kontrolle, CS: ungeprimte Pflanzen im Salzstress, PC: Salzgeprimte Kontrolle, PS: Salzgeprimte Pflanzen im Salzstress. Datenerhebung, -Analyse, und Darstellung: Lara Holz, Sara Beier, Forschungszentrum Jülich.

Priming ermöglicht grundsätzlich nicht nur Toleranzen gegen den Priming-induzierenden Stress (cis-Priming), sondern kann auch Toleranzen gegenüber anderen Stressen induzieren (Kreuztoleranz). Die Untersuchungen fokussierte sich auf mögliche Kreuztoleranzeffekte von Salz-Priming im Hinblick auf Kälte- und Hitzestress. Dabei zeigte das Priming keinen nachweisbaren Einfluss auf eine gesteigerte Toleranz gegenüber diesen Stressfaktoren. In Tabelle 4.1.1. ist die Stresstoleranz für die relative Wuchsrate (RGR) am Ende der Stressphase dargestellt. Bei nachfolgendem Salzstress kann für salz-geprimte Pflanzen eine um etwa 180% verbesserte relative Wuchsrate im Vergleich zu den ungeprimten Pflanzen im Salzstress erfasst werden (CS vs. PS). Bei Kältestress und vorherigem Kältepriming ist eine nahezu gleiche Stresstoleranz erkennbar, wenn die geprimten und ungeprimten Pflanzen unter Kältestress verglichen werden (CS vs. PS), bei Hitze-Priming und Hitzestress sind die geprimten Pflanzen sogar weniger tolerant und zeigten ein reduziertes Wachstum. Die Kreuztoleranzen zeigten ebenfalls keine Verbesserung mit 95% bei Kälte und nur leicht erhöhter (und im Vergleich der RGR nicht signifikanten) Stresstoleranz bei nachfolgendem Hitzestress. Tendenziell zeigten alle geprimten Pflanzen ein leicht verbessertes Wachstum unter Kontrollbedingungen (PC vs. CC).

Tabelle 4.1.1: Stresstoleranzen (%) bei verschiedenen Priming- und Folge-Stressen. CS vs. CC: Salzstress bei ungeprimten Pflanzen im Vergleich zur Kontrolle, PC vs. CC: Vergleich geprimte Pflanzen zu ungeprimten Pflanzen unter Kontrollbedingungen, PS vs. PC: Salzstresstoleranzen der geprimten Pflanzen und PS vs. CS: Vergleich der geprimten Pflanzen im Salzstress zu den ungeprimten Pflanzen im Salzstress. Datenerhebung, und -Analyse: Sara Beier, Anna Hildebrand, Forschungszentrum Jülich.

Salz-Priming und Salz-Stress - Cis-Priming	
CS vs. CC	21,08%
PC vs. PC	139,40%
PS vs. PC	37,71%
CS vs. PS	180,66%
Kälte-Priming und Kälte-Stress - Cis-Priming	
CS vs. CC	49,78%
PC vs. PC	116,54%
PS vs. PC	41,65%
CS vs. PS	97,50%
Hitze-Priming und Hitze-Stress - Cis-Priming	
CS vs. CC	86,72%
PC vs. PC	109,84%
PS vs. PC	53,56%
CS vs. PS	67,84%
Salz-Priming und Kälte-Stress - Kreuztoleranz	
CS vs. CC	36,4% ¹
PC vs. PC	110,03%
PS vs. PC	31,57%
CS vs. PS	95,42%
Salz-Priming und Hitze-Stress - Kreuztoleranz	
CS vs. CC	86,72%
PC vs. PC	124,30%
PS vs. PC	74,75%
CS vs. PS	107,15%

Priming von Jungpflanzen für Gewächshausstudien und AP4

Um die Wirkung des Primings auf junge Tomatenpflanzen im Gewächshaus zu untersuchen, stellten wir im Juli 2023 ca. 300 junge Tomatenpflanzen der Sorte M82 (je 150 geprimt und 150 ungeprimt) für Partner 2 an der Hochschule Geisenheim zur Verfügung. Dort und nach längerer Erholungsphase wurden diese geprimten und ungeprimten Pflanzen mit Salz- oder Hitze-Stress oder UV-Strahlung gestresst und phänotypisiert, um Stress- und Toleranzreaktionen zu quantifizieren (s. 4.2, Arbeitspaket 3). 300 Jungpflanzen der Sorte Adeleza (geprimt und ungeprimt) wurden für einen Demonstrationsversuch an der Landwirtschaftskammer NRW in Straelen zur Verfügung gestellt (Abb. 4.1.3), um das etablierten Priming-Verfahren zu überprüfen bzw. seine praktische Anwendbarkeit und Relevanz zu vergleichen. Weiterhin wurden für Partner 4 zur epigenetischen Untersuchung größere Mengen an Tomaten Jungpflanzen der Sorte M82 und Adeleza geprimt, um DNA-Methylierungs- und CHIP-Analysen zu ermöglichen. Dabei musste wegen defekten Klimakammern auf Klimakammern eines anderen Modelles ausgewichen werden, in denen gleiche Bedingungen eingestellt wurden, aber wegen unterschiedlicher Größe der Klimakammer, Leuchtmitteln und Belüftung, leicht veränderte Bedingungen zu den normalerweise genutzten Kammern vorlagen. Außerdem wurden entsprechend deutlich mehr Jungpflanzen gleichzeitig angezogen. Die Aufgabe, geprimte Jungpflanzen für weitere Gewächshausversuche an der Hochschule Geisenheim im Jahr 2024 bereitzustellen, konnte nicht erfüllt werden, da zum Zeitpunkt des geplanten Primings die entsprechenden Klimakammern defekt waren und auch ein Ersatz nicht verfügbar war. Hier wurden ersatzweise Pflanzen im Keimlingsstadium in Geisenheim geprimt.



Abbildung 4.1.3: Priming junger Tomatenpflanzen (Adeleza) für das Demonstrationsexperiment an der Landwirtschaftskammer NRW. Bild: Anika Wiese-Klinkenberg

Analyse der Expression von Markergenen und Pflanzeninhaltsstoffen

Die Messung sekundärer Metabolite zeigte, dass sich bei Salzstress in Blättern geprimter Pflanzen eine höhere Menge an Anthocyanen und Gesamtphenolen in den Blättern ansammelte (Abb. 4.1.4). Diese sekundären Inhaltsstoffe könnten einen Anteil an der durch das Priming vermittelte Salztoleranz haben. Bereits nach 24 Stunden Salzstress wiesen die geprimten Pflanzen einen erhöhten Gehalt an Totalphenolen auf (Abb. 4.1.4B).

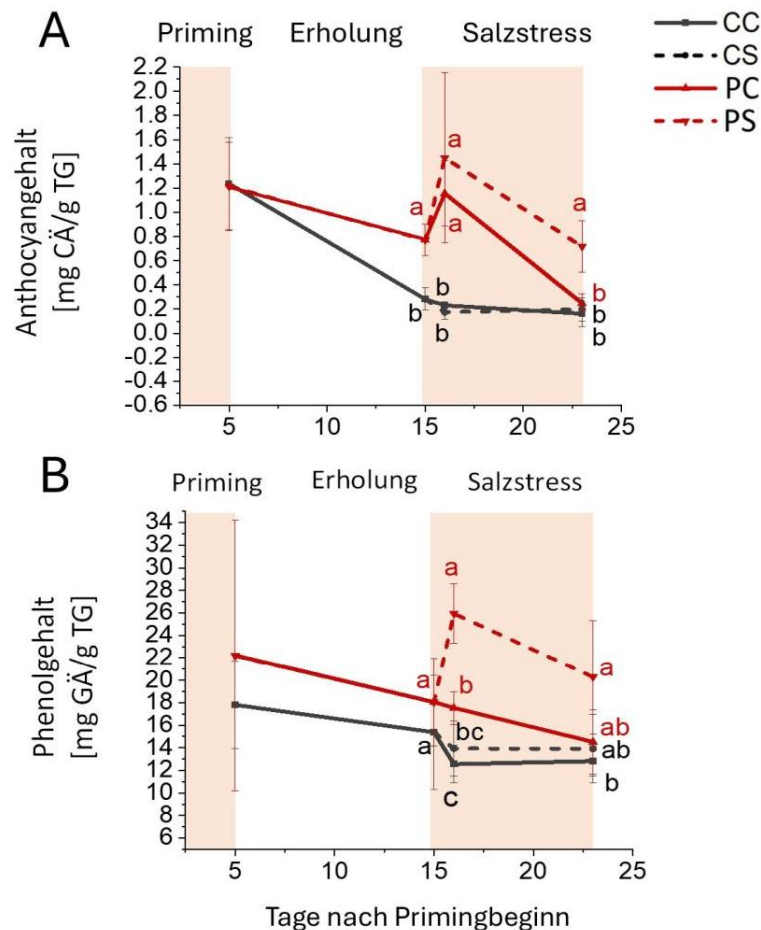


Abbildung 4.1.4: Einfluss von Salz-Priming auf Anthocyan- (A) und Phenolgehalt (B) in Blättern junger Tomatenpflanzen im Salzstress. Die Linien geben den Mittelwert $\pm$ SD an. Unterschiedliche Buchstaben bezeichnen signifikante Unterschiede am gleichen Erntetag gemäß dem Post-hoc-Tukey-Test ($p < 0,05$; $n = 4$). CC: ungeprimte Kontrolle, CS: ungeprimte Pflanzen im Salzstress, PC: Salzgeprimte Kontrolle, PS: Salzgeprimte Pflanzen im Salzstress. Gefärbte Bereiche zeigen Phasen der Salzbehandlung der entsprechenden Gruppen an. Datenerhebung, -Analyse, und Darstellung: Sara Beier, Forschungszentrum Jülich.

Auch Kältestress zeigte eine leichte Stimulation des Sekundärstoffwechsels bei wiederholtem Kältestress (Abb. 4.1.5, Bachelorarbeit A. Hildebrand, 2023), für die Totalphenole signifikant über ungeprimten Pflanzen im Kältestress, aber keine Auswirkung auf das Wachstum genauso wie die Hitzebehandlung von Jungpflanzen (Tabelle 4.1.1). Deshalb wurde das Kältepriming nicht weiter untersucht.

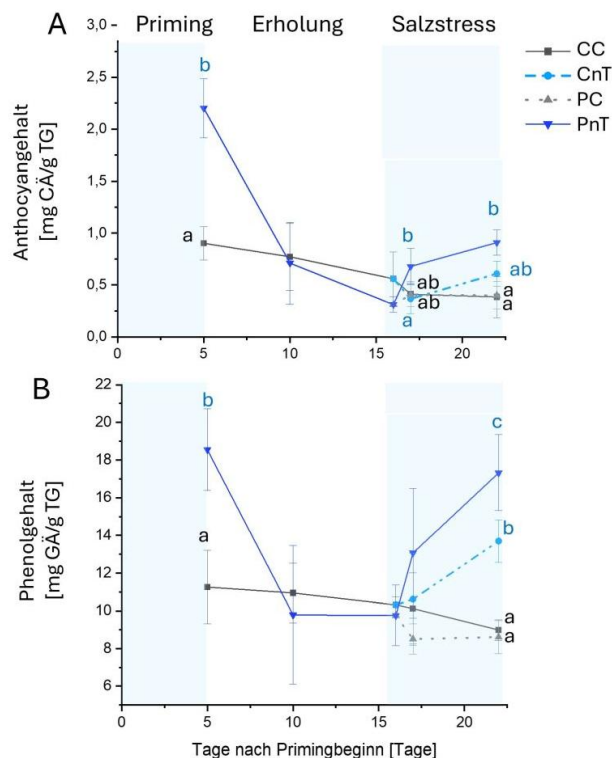


Abbildung 4.1.5: Einfluss von Kältepriming auf Anthocyan-(A) und Phenolgehalt (B) in Blättern junger Tomatenpflanzen bei Kältestress. Die Linien geben den Mittelwert $\pm$ SD an. Unterschiedliche Buchstaben bezeichnen signifikante Unterschiede gemäß dem Post-hoc-Tukey-Test ($p < 0,05$; $n = 4$). CC: ungeprimte Kontrolle, CnT: ungeprimte Pflanzen im Kältestress, PC: Kältegeprimte Kontrolle, PnT: Kältegeprimte Pflanzen im Kältestress. Unterschiedliche Buchstaben bezeichnen signifikante Unterschiede am gleichen Erntetag gemäß dem Post-hoc-Tukey-Test ($p < 0,05$; $n=4$. $n=3$ bei nT Tag 5). Blaue Bereiche kennzeichnen Phasen der Kältebehandlung der entsprechenden Gruppen. C= Kontrolle (kein Priming), nT= niedrige Temperatur. Datenerhebung, -Analyse, und Darstellung: Anna Hildebrand, Forschungszentrum Jülich.

Das etablierte Real-time-PCR-Protokoll ermöglichte, die Expression von Genen aus der Biosynthese sekundärer Metaboliten und anderer Markergenen zu quantifizieren und wurde später auch zur Bestätigung der Expression von Markergenen verwendet, die in RNA-Sequenzierungsergebnissen und in den epigenetischen Untersuchungen bei Partner 4 identifiziert wurden. Für die Real-time PCR wurden mithilfe von RefFinder (Xie et al., 2023) zwei Referenzgene ACTIN und Proteinphosphatase 2A (PP2A) (Løvdaal and Lillo 2009) als stabile Referenzgene unter Salz- und Kältestress ausgewählt. Dabei konnte gezeigt werden, dass der frühe Anstieg von sekundären Metaboliten in geprimten Pflanzen nach 24 Stunden Salzstress, mit einer höheren Expression des Dihydroflavonol-4-Reduktase (DFR)-Gens in Blättern einherging (Abb. 4.1.6A). Dieses Gen spielt eine wichtige Rolle in der Anthocyan-Biosynthese. Die Expression des Flavonol-Synthase (FLS)-Genes aus der mit dem DFR-Enzym um das gleiche Substrat konkurrierenden Flavonolsynthese ist nicht durch Priming bei Salzstress induziert, zeigt aber eine Induktion durch den Salzstress unabhängig vom Priming (Abb. 4.1.6B).

Die Expression von zwei über Literaturrecherche ausgewählte Salzstress-Markergenen, dem Salz-induzierten und salztoleranz-vermittelnden Plasmamembran- Na^+H^+ -Antiporter (SOS1, (Olías et al. 2009) und der Delta-1-Pyrrolin-5-Carboxylat-Synthase 1 (P5CS1) aus der Prolin Biosynthese, das in *Arabidopsis thaliana* durch Salzstress induziert wird und dabei durch vorheriges Salz-Priming zu höherer Induktion angeregt wird (Feng et al. 2016), reagierte ebenfalls

nicht positiv auf das Priming (Abb. 4.1.6C und D). P5CS1 zeigte aber eine tendenzielle Induktion durch den Salzstress.

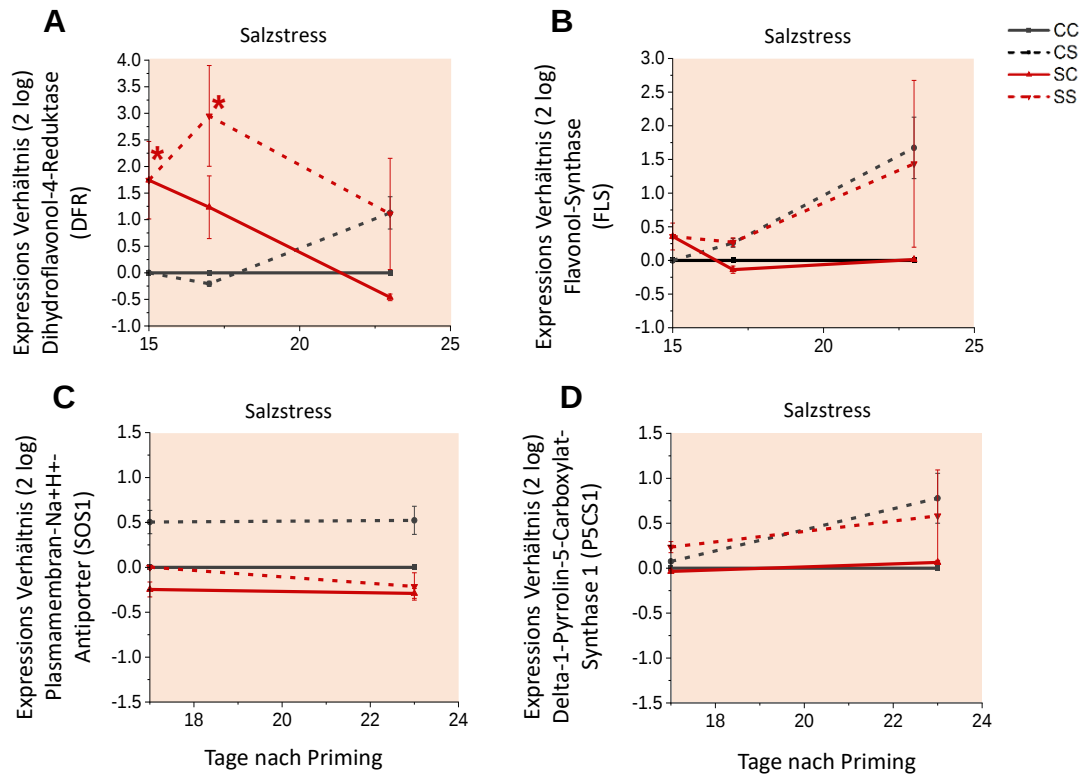


Abbildung 4.1.6: Einfluss von Salzstress und Salzstress-Priming auf die relative Expression des (A) Dihydroflavonol-4-Reduktase Genes (DFR), (B), des Flavonol-Synthase Genes (FLS), (C) des Plasmamembran-Na⁺H⁺-Antiporter Genes (SOS1) und (D) des Delta-1-Pyrrolin-5-Carboxylat-Synthase 1 Genes (P5CS1) in Blättern junger Tomatenpflanzen, die teilweise 5 Tage lang mit Salz (200 mM) geprimt wurden und nach 10-tägiger Erholung weitere 8 Tage lang anschließend Salzstress (200 mM) gestresst wurden. Die Linien geben den Mittelwert $\pm$ SD an. Die Genexpression wurde auf ACTIN und PPA2 normalisiert. Gezeigt ist eine log2-fache Änderung. Sternchen zeigen einen signifikanten Unterschied der Genexpression im Vergleich zur Kontrolle (CC) an, bestimmt mit REST. ($p < 0,05$; $n = 4$). CC: ungeprimte Kontrolle, CS: ungeprimte Pflanzen im Salzstress, SC: Salzgeprimte Kontrolle, SS: Salzgeprimte Pflanzen im Salzstress. Datenerhebung, -Analyse, und Darstellung: Sara Beier, Forschungszentrum Jülich.

RNA-Seq Genexpressionsstudie

Um die Wirkung des Primings auf die Genexpression in jungen Tomatenpflanzen zu untersuchen, wurde Gesamt-RNA aus Blattmaterial von geprimten und ungeprimten Pflanzen vom Ende der Erholungsphase, nach 24 Stunden Salzstress und nach 8 Tagen Salzstress extrahiert. Nach der Sequenzierung wurde eine Prinzipalkomponentenanalyse (PCA) mit normalisierten Daten durchgeführt (Abb. 4.1.7). Die drei RNA-Proben die zu jedem Zeitpunkt/jeder Behandlung untersucht wurden zeigen darin eine einander sehr ähnliche Variation. Die PCA zeigte, dass am Ende der Erholungsphase (0h_S und 0h_C) geprimte und ungeprimte Pflanzen wenig Veränderung in der Genexpressionen zeigten. Der Salzstress erzeugt eine größere Variation zu den Pflanzen ohne Salzstress, dabei trennen sich die geprimten Proben von den ungeprimten Proben im Salzstress deutlich (24h_CS und 24h_PS sowie und 8d_CS und 8d_SS). Die Expression in geprimten und ungeprimten Pflanzen konnte zum letzten Erntezeitpunkt (8d = 8 Tage) auch ohne

Salzstress voneinander unterschieden werden (8d_CC und 8d_SC), was auch auf eine grundlegend veränderte Variation in der Genexpression durch das Priming hinweist (Abb.4.1.7).

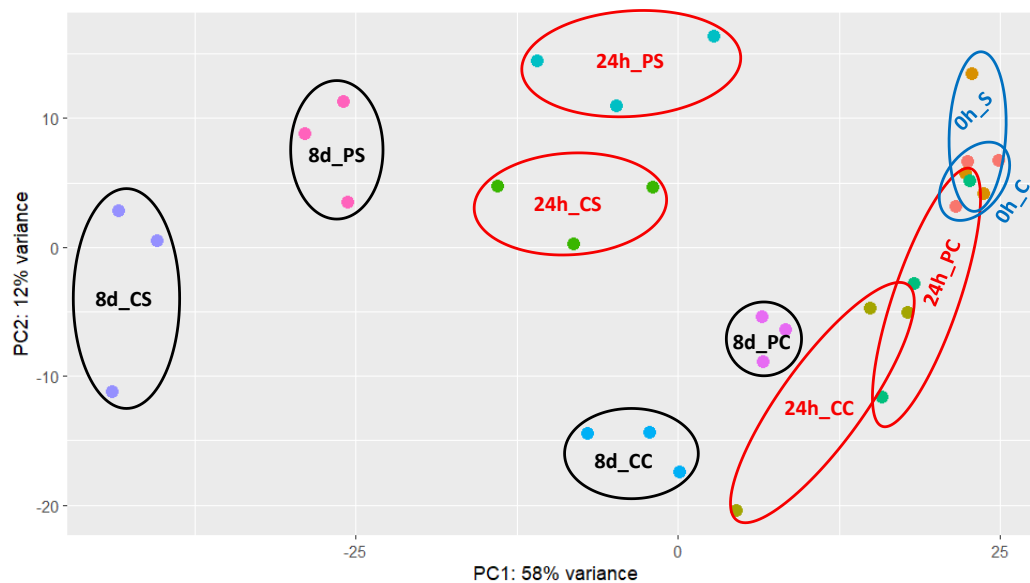


Abbildung 4.1.7: Prinzipalkomponentenanalyse (PCA) zu den Veränderungen der Transkriptome in Blättern von im RNA-Sequenzierungsexperiment untersuchten Blättern junger Tomatenpflanzen, die zu verschiedenen Zeitpunkten geerntet wurden und geprimt und ungeprimt in Salzstress oder unter Kontrollbedingungen angezogen wurden. 0h = Erntezeitpunkt nach der Erholungsphase, 24h = Erntezeitpunkt nach 24h Salzstress, 8d = Erntezeitpunkt nach 8 Tagen Salzstress. CC: ungeprimte Kontrolle, CS: ungeprimte Pflanzen im Salzstress, PC: Salz-geprimte Kontrolle, PS: Salz-geprimte Pflanzen im Salzstress. Blaue Umrandung: Proben nach Erholungsphase, rote Umrandung: Proben nach 24 Stunden Salzstress, schwarze Umrandung: Proben nach 8 Tagen Salzstress. Datenerhebung, -Analyse, und Darstellung: Sara Beier, Forschungszentrum Jülich.

Um das Expressionsverhältnis von Genen zwischen den Behandlungen quantitativ zu vergleichen, führten wir eine Identifikation von signifikant (FDR korrigierter p-value $p > 0.05$) und 2-fach oder höher hoch- oder runterregulierten Genen durch. Diese Analyse zeigte, dass die Anzahl der Gene, die nach der Erholungsphase sowohl in Kontroll- als auch in geprimten Pflanzen differenziell exprimierten (DEGs) gering war (Abb. 4.1.8 und Tabelle 4.1.2), was eine nahezu vollständige Erholung von dem vorangegangenen Stress anzeigt.

Schon nach 24 Stunden Salzstress konnten >1.000 differenziell regulierte Gene (DEGs) identifiziert werden (Abb. 4.1.8 und Tabelle 4.1.2). Ungeprimte Pflanzen (CS vs. CC 1 Tag) zeigten dabei nach 24 Stunden eine etwas weniger starke Induktion von Genen als die geprimten Pflanzen (PS vs. PC 1 Tag). Die geprimten Pflanzen wiesen dabei eine deutlich erhöhte Anzahl an hochregulierten Genen auf, von 1.365 waren mit 1.267 Genen 93% der regulierten Gene hochreguliert, während in ungeprimten Pflanzen mit 55% hochregulierten Genen ein ausgeglichenes Verhältnis vorlag (Tabelle 4.1.2). Eine ähnliche Regulation konnte auch in dem RNA Seq Experiment zu den CHIP-Proben in AP4 beobachtet werden, auch hier waren beim Vergleich der Genexpression geprimter Pflanzen im Salzstress zu ungeprimten Pflanzen im Salzstress deutlich weniger Gene reprimiert als induziert (Abb. 4.5.3). Nach 8 Tagen Salzstress vergrößerte sich die Stärke der transkriptionellen Reaktionen in ungeprimten Pflanzen (CS vs. CC 8 Tage). Die Menge der Gene, die in geprimten Pflanzen unterschiedlich auf 8 Tage Salzstress reagierten, lag dabei nur bei 50 % der ungeprimten Pflanzen (PS vs. PC 8 Tage, Abb. 4.1.8 und Tabelle 4.1.2).

Der Vergleich von geprimten Pflanzen zu ungeprimten Pflanzen im Salzstress (PS vs. CS) zeigte den durch das Priming verursachten Unterschied im Salzstress an und so Gene, die direkt mit der verbesserten Stressreaktion und der vermittelten Salzstresstoleranz zusammenhängen könnten. Hier konnten >500 DEGs schon nach 24 Stunden identifiziert werden, nach 8 Tagen waren es >2.000 Gene. Solche Gene können interessante Kandidatengene für das Verständnis von durch Priming induzierte Stresstoleranzen sein. Im Salzstress wurden bei geprimten Pflanzen verglichen zu ungeprimten Pflanzen im Salzstress die meisten Gene nach 24 Stunden Salzstress hochreguliert und nach 8 Tagen zweitem Salzstress herunterreguliert (Abb. 4.1.8 und Tabelle 4.1.2).

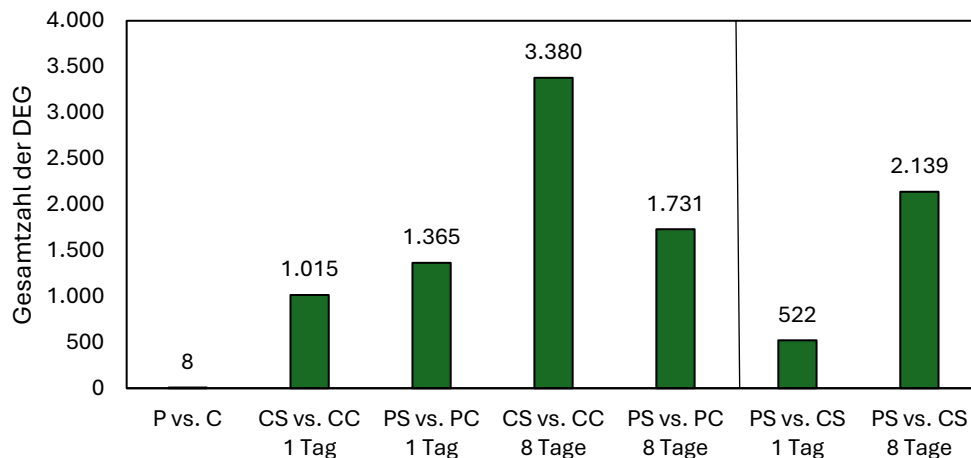


Abbildung 4.1.8: Anzahl der differenziell exprimierten Gene (DEG). Vergleiche von Transkriptomen zwischen Kontrollen und Salz-behandelten (CS vs. CC und PS vs. PC) und geprimten und ungeprimten Pflanzen (PS vs. CS) A: Gesamtzahl differenziell exprimierte Gene (DEGs). CC: ungeprimte Kontrolle, CS: ungeprimt im Salzstress, PC: Salz-geprimte Kontrolle, PS: Salz-geprimt im Salzstress. Datenerhebung, -Analyse, und Darstellung: Sara Beier, Anika Wiese-Klinkenberg, Forschungszentrum Jülich.

Tabelle 4.1.2: Anzahl differenziell exprimierter Gene (DEG) in geprimten und ungeprimten Pflanzen nach Erholungsphase (P vs. C) und nach einem und acht Tagen Salzstress. Dabei Vergleiche zu jeweils geprimten und ungeprimten Pflanzen in Kontrollbedingungen (CS vs. CC und PS vs. PC) und auch der Vergleich von geprimten und ungeprimten Pflanzen im Salzstress (PS vs. CS). Farbkodierung: hohe Werte rot, niedrige Werte blau. Datenerhebung, -Analyse, und Darstellung: Sara Beier, Forschungszentrum Jülich.

	P vs. C	CS vs. CC		PS vs. PC		PS vs. CS	
	Erholung	1 Tag	8 Tage	1 Tag	8 Tage	1 Tag	8 Tage
Induzierte DEG	6	562	2.154	1.267	1.121	475	487
Reprimierte DEG	2	453	1.226	98	610	47	1.652
Gesamt DEG	8	1.015	3.380	1.365	1.731	522	2.139

Um die funktionale Bedeutung der Expressionsänderungen in geprimten und nicht geprimten Pflanzen für die verbesserte Salztoleranz zu unterschiedlichen Zeitpunkten besser zu verstehen, führten wir unter Verwendung von Mercator4 (Bolger et al. 2021) eine Anreicherungsanalyse für die identifizierten DEGs durch.

Die Anreicherungsanalyse zeigte, dass es in geprimten Pflanzen verglichen zu ungeprimten Pflanzen nach 24 Stunden zweitem Salzstress große Gruppen angereicherter Funktions-Gruppen mit regulierten Genen gab, die in Blättern deutlich überrepräsentiert waren (Tabelle A4.1.1 im Anhang). Diese Anreicherung von Genen war hauptsächlich an dem Phytohormon Cytokinin, der Chromatinorganisation, der Zellteilung, der Enzymklassifizierung und dem Sekundärstoffwechsel der Terpenbiosynthese und der Synthese von phenolischen

Sekundärmetaboliten beteiligt, was zu den gesteigerten Gehalten sekundärer Metaboliten bereits nach 24 Stunden Salzstress in den zuvor gezeigten Ergebnissen passt (Abb. 4.1.4). Nach 8 Tagen des zweiten Salzstress reicherten sich beim Vergleich geprimter Pflanzen zu ungeprimten Pflanzen hauptsächlich bei den hochregulierten Genen solche an, die den Gruppen Photosynthese (Tabelle A4.1.5 im Anhang), Chromatinorganisation, Proteinhämostase sowie Enzym- und Coenzym-Stoffwechsel zugeordnet wurden (Tabelle A4.1.2 im Anhang). Die herunterregulierten Gene reichern sich bei der RNA-Biosynthese, Proteinmodifikation, dem Transport gelöster Stoffe, der Pathogenrezeptor- und Enzymklassifizierung an.

Für die frühe Salzstressreaktion (nach 24 Stunden Salzstress) in ungeprimten Pflanzen wurde eine Überrepräsentation im Zusammenhang mit Abscisinsäure (ABA) festgestellt, (Tabelle A4.1.3 im Anhang). Die Rolle von ABA in der Salzstress liegt in der Wachstumsinhibition, der Regulation von Stomata zur Reduktion von Wasserverlust und einer allgemeinen Regulation weiterer Prozesse für die Salzstressregulation (Boorboori and and Li 2025). Die Chromatinorganisation war überrepräsentiert, dabei besonders die DNA-Verpackung und Histonen H3-H4-Tetramere. Die Kategorie Zellteilung war überrepräsentiert. In der Kategorie RNA Biosynthese war die Gruppe der Transkriptionsfaktoren vom Typ Helix-Turn-Helix-DNA-Bindungsdomäne-HOMEODOMÄNE-HD-ZIP I/II mit acht Genen und die Gruppe der Transkriptionsfaktoren vom Typ RADIALIS mit sechs Genen überrepräsentiert. Ein RADIALIS Transkriptionsfaktor wurde in Reis ebenfalls bei Salzstress induziert, eine Mutante zeigte eine erhöhte Salzsensitivität (Park et al. 2018). Die Proteinsynthese war überrepräsentiert, vor allem mit Genen der Ribosombiogenese. Der Stofftransport durch die Major-Facilitator-Superfamilie war bei den DEGs der frühen Salzreaktion überrepräsentiert, wobei 13 Gene speziell mit dem Anionentransport zusammenhängen, was mit dem durch den Salzstress veränderten Ionengehalt zusammenhängen kann. Kategorien der Kalzium-abhängigen Signalübertragung, CBL-CIPK-Kalzium-Sensor- und -Kinase-Wege und des Phytosterol-Stoffwechsels waren bei den DEGs der frühen Salzstressreaktion überrepräsentiert. Veränderungen in Kategorien, die mit Proteinmodifikation zu tun haben, zeigten sich in der Überrepräsentation von SnRK3 SNF-verwandten Kinasen und PPM/PP2C Mn/Mg-abhängigen Phosphatasen.

Nach acht Tagen Salzstress war die Photosynthese in ungeprimten Pflanzen eindeutig durch Salzstress beeinträchtigt, wobei 102 Gene überrepräsentiert waren, die hauptsächlich zur Photophosphorylierung gehören. Bei der Analyse der Überrepräsentation von herunterregulierten Genen fanden wir die meisten Photosynthese-Gene in dieser Gruppe (94 herunterregulierte Gene) überrepräsentiert (Tabelle A4.1.5 im Anhang). Größere Veränderungen wurden auch in der Kategorie der Phytohormonwirkung festgestellt, was auf größere Umstrukturierungen bei der Hormonsignalisierung und -synthese/-umsetzung hindeutet. Der Stofftransport nach acht Tagen Salzstress war mit 221 Genen überrepräsentiert. In der Kategorie Enzymklassifikation waren Oxidoreduktasen und Glykosyltransferasen überrepräsentiert. Der Sekundärstoffwechsel für phenolische Metaboliten war mit 26 Genen überrepräsentiert, wobei die meisten Gene hochreguliert waren. Einige Kategorien waren unterrepräsentiert: Chromatinorganisation, RNA-Verarbeitung, Proteinsynthese, Vesikeltransport und Proteintranslokation. Diese Prozesse sind nur durch eine signifikant geringe Anzahl von Genen vertreten (Tabelle A4.1.4 im Anhang).

Die unterschiedliche Anreicherung der Gene zwischen 24 Stunden und 8 Tagen des zweiten Salzstress in geprimten und ungeprimten Pflanzen zeigte, dass die Reaktion dieser Pflanzen über verschiedene Stresszeiten hinweg sehr dynamisch ist.

Ausgewählte Gene wurden in realtime PCR überprüft, die normalisierten Counts pro Gen zeigten dabei eine gute Übereinstimmung mit dem delta-delta-CT (ddCT)-Wert aus der realtime PCR (Abb. 4.1.9).

Zeitpunkt		N. Erholung		24 Stunden				8 Tage			
Behandlung		C	S	CC	CS	PC	PS	CC	CS	PC	PS
RNA Seq cmp	m82_HG975515.1_001520	1060,6	1208,4	979,2	453,9	1108,2	476,7	817,9	40,5	1182,8	334,2
RT-PCR ddCT	ABP19a	1,0	1,1	1,0	0,4	1,1	0,5	1,0	0,1	1,5	0,3
RNA Seq cmp	m82_HG975518.1_002241	1,1	1,4	0,3	0,1	1,0	0,8	0,3	0,0	0,4	0,0
RT-PCR ddCT	ARR7	1,0	1,2	1,0	0,2	1,7	1,7	1,0	0,1	1,3	0,1
RNA Seq cmp	m82_HG975517.1_000061	27,1	27,2	36,3	14,8	52,5	44,1	44,9	18,2	39,5	29,6
RT-PCR ddCT	ARR3	1,0	1,3	1,0	0,4	1,3	1,9	1,0	0,5	0,9	0,6
RNA Seq cmp	m82_HG975518.1_002503	0,5	8,7	0,3	1,5	3,1	15,3	0,2	6,5	0,4	1,7
RT-PCR ddCT	ASN1	1,0	1,2	1,0	1,6	1,9	12,6	1,0	5,3	0,7	2,5
RNA Seq cmp	m82_HG975521.1_000850	5,2	21,1	11,0	8,4	27,9	54,2	10,7	21,6	7,4	19,1
RT-PCR ddCT	F3,5M	1,0	3,8	1,0	0,8	2,0	6,5	1,0	2,4	0,7	2,1
RNA Seq cmp	m82_HG975522.1_001830	0,0	0,5	0,1	0,1	0,0	2,0	0,0	0,8	0,1	0,3
RT-PCR ddCT	NRT1/PTR	1,0	2,7	1,0	1,4	1,3	16,5	1,0	8,0	1,3	4,0
RNA Seq cmp	m82_HG975521.1_000889	1,7	3,1	1,6	14,8	2,1	36,9	9,4	9,2	8,8	59,0
RT-PCR ddCT	PR6 protease inhibitor	1,0	1,8	1,0	5,5	1,3	18,3	1,0	0,5	0,5	1,9
RNA Seq cmp	m82_HG975521.1_000413	220,2	225,0	253,4	144,6	265,5	181,4	158,5	25,6	262,2	98,1
RT-PCR ddCT	SILTPb	1,0	1,0	1,0	0,4	0,9	0,8	1,0	0,1	1,1	0,4
RNA Seq cmp	m82_HG975520.1_000427	34,5	70,9	22,6	19,7	58,7	95,8	31,8	30,3	44,1	13,4
RT-PCR ddCT	Zinc transporter	1,0	1,2	1,0	1,0	2,3	3,1	1,0	0,7	1,0	0,4
RNA Seq cmp	m82_HG975514.1_001968	0,3	3,2	0,3	3,2	0,3	47,4	1,5	1173,1	1,3	353,6
RT-PCR ddCT	TAS14	1,0	2,6	1,0	43,3	2,5	369,5	1,0	492,5	0,3	158,8
RNA Seq cmp	m82_HG975514.1_000832	3,4	11,0	6,6	8,0	17,8	35,9	7,9	18,5	5,1	13,4
RT-PCR ddCT	TT19	1,0	2,9	1,0	1,2	2,0	6,2	1,0	3,1	0,7	2,3
RNA Seq cmp	m82_HG975514.1_001020	7,1	25,2	12,6	10,4	32,8	63,5	11,6	24,4	9,5	18,9
RT-PCR ddCT	DFR	1,0	2,9	1,0	0,8	1,9	6,7	1,0	2,2	0,6	1,8
RNA Seq cmp	m82_HG975515.1_000001	62,5	61,2	71,8	76,8	61,0	62,3	89,3	88,0	82,7	85,3
RT-PCR ddCT	CEN	1,0	2,2	1,0	69,6	0,7	15,2	1,0	8,0	0,6	5,2
RNA Seq cmp	m82_HG975519.1_002054	0,3	0,7	0,5	0,4	0,8	2,7	0,6	0,4	0,5	0,4
RT-PCR ddCT	def4	1,0	1,7	1,0	0,7	1,7	3,7	1,0	0,8	0,7	0,9

Abbildung 4.1.9: Vergleich real-time qPCR-Ergebnisse (ddCT, relative Genexpression, normalisiert auf die Referenzgene ACT und PPA2 und auf die Expression in der Probe C (nach Erholungsphase) oder CC (nach 24 Stunden und nach 8 Stunden). Normalisierte counts der RNA-Sequenzierung (aus DEseq2). Farbcode zeigt jeweils zum gleichen Erntetage in RNA-Seq oder RT-PCR hohe Werte in rot, niedrige Werte in blau. Bezeichnung der Primer und Funktion der Gene sind in Tabelle 3.1.2 erläutert. CC: ungeprimte Kontrolle, CS: ungeprimte Pflanzen im Salzstress, PC: Salz-geprimte Kontrolle, PS: Salz-geprimte Pflanzen im Salzstress. Datenerhebung, -Analyse, und Darstellung: Sarah Spettmann, Anika Wiese-Klinkenberg, Forschungszentrum Jülich.

Von den acht Genen, die nach der Erholungsphase signifikant differenziell reguliert waren, waren sechs Gene induziert. Vier Gene davon konnten der Biosynthese oder dem Transport von Sekundärmetaboliten zugeordnet werden (Abb. 4.1.10A): eine Flavonoid 3,5-methyltransferase (F35, m82_hg975521.1_000850.1) und eine Dihydroflavonol 4-Reduktase (DFR, m82_hg975514.1_001020.1). Eine UDP-Glycosyltransferase 75C1 (m82_hg975524.1_000968.1), war nach der Erholung induziert, in *Arabidopsis thaliana* zeigt eine UDP-glycosyltransferase 75C1 (At4g14090) Anthocyanin 5-O-glucosyltransferase (5GT) Aktivität (Tohge et al. 2005). Ein MATE Transporter („Detox34“, Solyc03g025190, m82_hg975515.1_000189.1) war hochreguliert, der zu einer MATE Transporter Gruppe gehört, die im Transport von Sekundärmetaboliten eine Rolle spielen (Santos et al. 2017). Weiterhin wurde eine Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (ATP) 1

(m82_hg975524.1_000784.1; Solyc12g088160) reguliert. Diese fünf Gene zeigten außerdem auch eine signifikante Änderung beim Vergleich salzgeprimter Pflanzen im Salzstress zu ungeprimten Pflanzen im Salzstress nach 24 Stunden (Abb. 4.1.10 A und B, PS vs. CS), sie waren nach der Erholungsphase vor-induziert. Die Expression des Dihydroflavonol 4-Reduktase Genes (DFR) und des Flavonoid-3,5-methyltransferase-Genes (F35) nach 24 h Salzstress wurde in real time qPCR bestätigt (Abb. 4.1.10C).

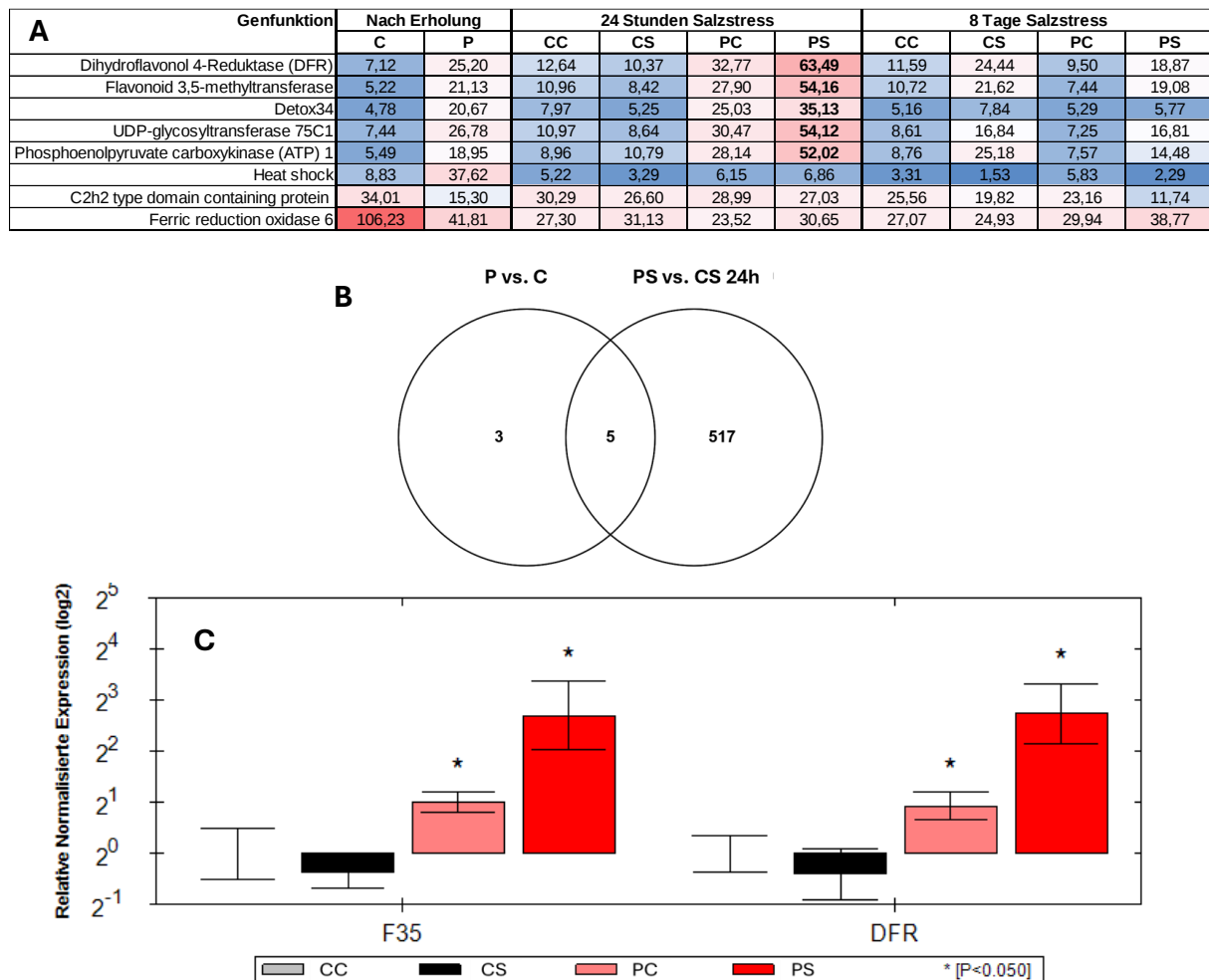


Abbildung 4.1.10: Gene, die nach der Erholungsphase reguliert sind. A: Normalisierte Counts aus der RNA-Sequenzierung mit DE2seq normalisiert. Farbkodierung im Gesamtvergleich, rot: hohe Werte, blau: niedrige Werte. B: Venn-Diagramm von DEGs nach der Erholungsphase und DEGs die in geprimten Pflanzen im Salzstress im Vergleich zu ungeprimten Pflanzen nach 24 Stunden differenziell exprimiert sind. C: Real time qPCR für die Gene Flavonoid-3,5-Methyltransferase (F35) und DFR, Relative normalisiert Log2-fache Expression nach 24 Stunden Salzstress, relativ zu CC. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung, Sternchen zeigen signifikante Änderung zur Kontrolle CC mit $p \leq 0.05$ nach one-way ANOVA in der CFX-Maestro Software. CC = Kontrolle ungeprimt und ohne Salzstress, CS = ungeprimte Pflanzen im Salzstress, PC = geprimte Pflanzen ohne Salzstress, PS = geprimte Pflanzen mit Salzstress. Datenerhebung, -Analyse, und Darstellung: Sara Beier, Sarah Spettmann, Anika Wiese-Klinkenberg, Forschungszentrum Jülich.

Ein Gen, m82_hg975519.1_000065.1 das früh im Salzstress in geprimten Pflanzen deutlich stärker exprimiert war, als in ungeprimten Pflanzen im Salzstress kodiert für ein Defensin. Diese stärkere Regulation konnte in RT-PCR bestätigt werden. Dabei war die Expression signifikant gesteigert in Vergleich zu den ungeprimten Pflanzen in Kontroll- (CC) und unter Salzstressbedingungen (CS) (Abb. 4.1.11).

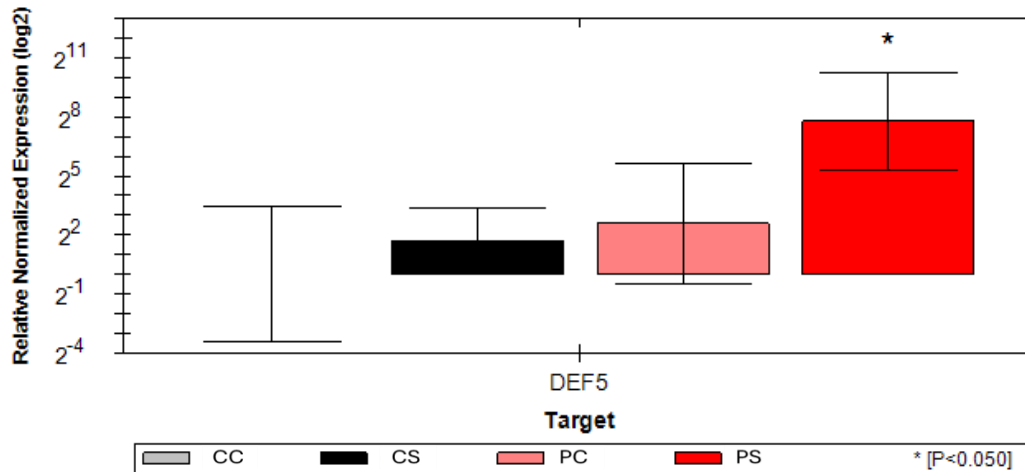


Abbildung 4.1.11: Expression von *DEF5* (m82_hg975519.1_000065.1). Real time qPCR, relative normalisierte Log2-fache Expression, relativ zu CC nach 24 Stunden Salzstress, Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung, Sternchen zeigen signifikante Änderung zur Kontrolle CC mit $p \leq 0.05$ nach one-way ANOVA in der CFX-Maestro Software. $n=4$. Datenerhebung, -Analyse, und Darstellung: Sarah Spettmann, Sara Beier, Anika Wiese-Klinkenberg, Forschungszentrum Jülich.

Die durch Priming im Salzstress stimulierte Expression wurde mit der mit der Salzstressreaktion ungeprimter Pflanzen verglichen, um die Priming-typische Reaktion sogenannter „memory“-Gene zu identifizieren, die unter dem Priming induzierendem Stress bereits reagieren (CS vs. CC) und bei wiederkehrendem Stress eine 1) stärkeren Expression von durch Salzstress regulierten Genen und/oder 2) eine frühere Expression von durch Salzstress regulierten Genen zeigen (Pratx et al. 2024). Dabei wurden die differenziell hochregulierten Gene der CS zu CC-Vergleiche nach 24 Stunden und 8 Tagen mit den differenziell hochregulierten Genen des PS zu CS-Vergleiches in einem Venn Diagramm abgeglichen, ebenso wurden die reprimierten Gene dieser Vergleiche miteinander verglichen (Abb. 4.1.12).

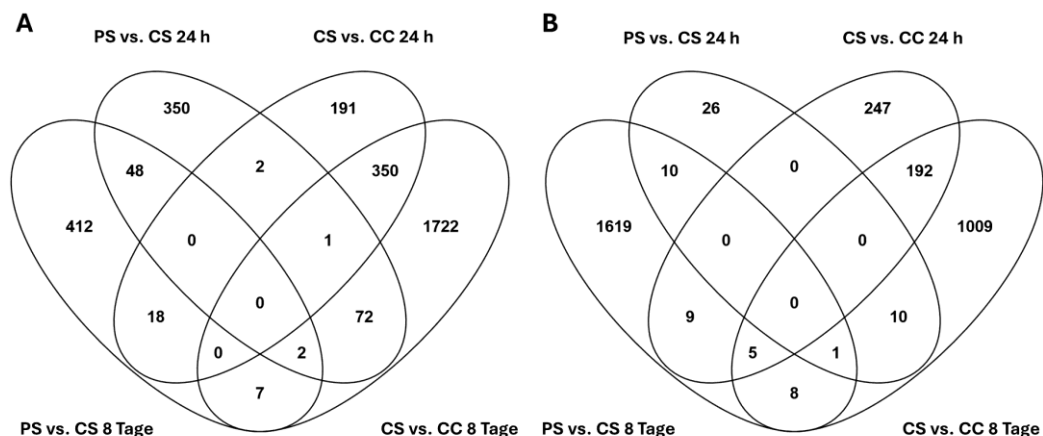


Abbildung 4.1.12: Venn-Diagramme mit überlappenden DEGs Salzstress regulierter Gene in un-geprimten Pflanzen (CS vs. CS) und DEGs die bei Salzstress in geprimten Pflanzen stärker reguliert sind als in ungeprimten Pflanzen unter Salzstress (PS vs. CS). A: hochregulierte Gene, B: Reprimierte Gene. Datenerhebung, Analyse, und Darstellung: Sara Beier, Anika Wiese-Klinkenberg, Forschungszentrum Jülich.

Dabei wurden drei hochregulierte Gene, die nach 24 Stunden in ungeprimten Pflanzen durch Salzstress induziert wurden, auch als Gene identifiziert, die durch das Priming eine signifikant erhöhte Expression bei Salzstress zeigten (Abb.4.1.12A). Umgekehrt wurden keine Gene gefunden, die im Vergleich zur Salzstressantwort ungeprimter Pflanzen reprimiert waren und in geprimten Pflanzen im Vergleich zu ungeprimten Pflanzen eine stärkere Repression zeigten (Abb.4.1.12B). Ein Gen, das unter Salzstress früh induziert wird und in geprimten Pflanzen signifikant stärker hochreguliert wird ist TAS14 (Solyc02g084850/ m82_hg975514.1_001968.1) (Abb.4.1.13 A/C). Nach 8 Tagen Salzstress ist TAS 14 in geprimten Pflanzen dann schon weniger stark exprimiert als in ungeprimten Pflanzen (Abb. 4.1.13B). Zwei weitere Gene wurde identifiziert: Das zweite Gen war m82_hg975516.1_002497.1/Solyc04g008900.2.1, das von swissprot als *UPF0481-Protein (like Arabidopsis At3g47200)* annotiert wurde, ein Protein mit sogenannten „Domains of unknown function“ (DUF247). Das dritte Gen, m82_hg975519.1_000254.1/Solyc07g016080, kodiert für eine Lysin-Decarboxylase, die am Putrescin/Spermidin-Biosyntheseweg beteiligt ist.

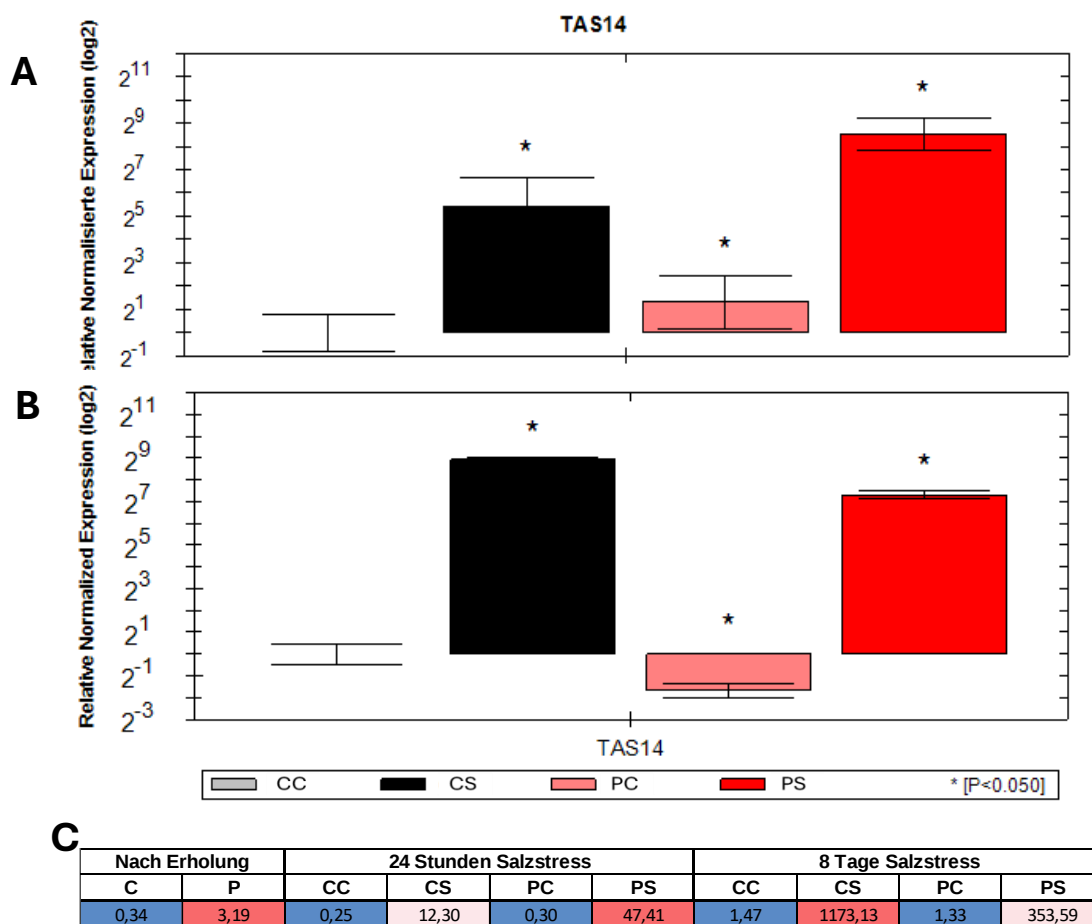


Abbildung 4.1.13: Expression von TAS14. A, B: Real time qPCR, relative normalisierte Log2-fache Expression, relativ zu CC, A: nach 24 Stunden Salzstress, B: nach 8 Tagen Salzstress. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung, Sternchen zeigen signifikante Änderung zur Kontrolle CC mit $p \leq 0.05$ nach one-way ANOVA in der CFX-Maestro Software. $n = 4$. C: gemittelte normalisierte counts für das Gen TAS14 aus der RNA-Sequenzierung ($n = 3$). Farbkodierung pro Erntetag, rot: hohe Werte, Blau: niedrige Werte. Datenerhebung, -Analyse, und Darstellung: Sarah Spettmann, Sara Beier, Anika Wiese-Klinkenberg, Forschungszentrum Jülich.

Priming kann eine veränderte Genregulation auslösen, die zu verstärkter Genexpression wie für TAS14 oben beschrieben oder zu einer früheren Regulation von Genen führen kann. Deshalb wurden Gene die in der Salzstress-Antwort von jungen Tomatenpflanzen später (nach 8 Tagen) reguliert waren, verglichen mit Genen, die in geprimten Pflanzen bereits früher reguliert wurden (nach 24 Stunden, Vergleich der Gene aus PS vs. CS_24h und CS vs. CC nach acht Tagen).

So wurden 75 Gene identifiziert, die erst nach 8 Tagen im Salzstress in ungeprimten Pflanzen induziert wurden, und schon nach 24 Stunden in Salzstress geprimten Pflanzen verglichen zu ungeprimten Pflanzen in Salzstress verstärkt exprimiert wurden. Diese Gene sind schneller/stärker in geprimten Pflanzen induziert als in ungeprimten Pflanzen. Zu diesen Genen zählte ebenfalls das TAS14 Gen und auch das Gen NRT1 (m82_HG975522.1_001830) das für einen Anionentransporter (NRT1/PTR) kodiert. Eine Mercator4 Anreicherungsanalyse mit diesen 75 Genen zeigte eine starke Anreicherung von Genen (Abb.4.1.14) die mit der Flavonoidbiosynthese in Verbindung gebracht werden, was eine wichtige Rolle der Flavonoidbiosynthese als Teil der verbesserten und früheren Stressreaktion in geprimten Pflanzen anzeigt.

Wie in AP4 (unter 4.5) konnte auch hier nach 24 Stunden Salzstress das Gen m82_HG975522.1_001830/ M82_10g024490.2/NRT1 mit signifikant erhöhter Expression in geprimten Pflanzen im Vergleich zu ungeprimten Pflanzen im Salzstress (CS vs. PS) identifiziert werden (Abb. 4.1.15). Dieses Gen zeigt eine signifikante Veränderung in der Tri-Methylierung von Histon 3 (H3K27me3), wie unter 4.5 weiter beschrieben, welche für die gesteigerte Expression bei Salzstress verantwortlich sein könnte. NRT1 kann als ein Priming Gen erkannt werden, das durch epigenetische Modifikationen angepasst für eine bessere Stressreaktion bei wiederkehrendem Salzstress modifiziert wurde. In real time PCR konnte bestätigt werden, dass das Gen schon nach 24 Stunden Salzstress stark und signifikant erhöht wurde (Abb. 4.1.15A), und auch, dass es erst nach 8 Tagen Stress in ungeprimten Pflanzen bei Salzstress stark induziert wurde (Abb. 4.1.15B).

Proben aus dem Demonstrationsexperiment in Straelen wurden auf die Expression der identifizierten Markergene untersucht. Dabei konnte weder für das sehr stark durch Salz regulierte und durch Priming weiter stimuliert Gen TAS14, noch für NRT1, das veränderte Histonmodifikationen aufwies eine veränderte Expression durch den Salzstress oder das Priming beobachtet werden (nicht gezeigt).

Ergebnisse zum Salz-Priming und zur Genexpression in Tomatenjungpflanzen werden in Beier et al. (2025) veröffentlicht und diskutiert und dem Fachpublikum zugänglich gemacht.

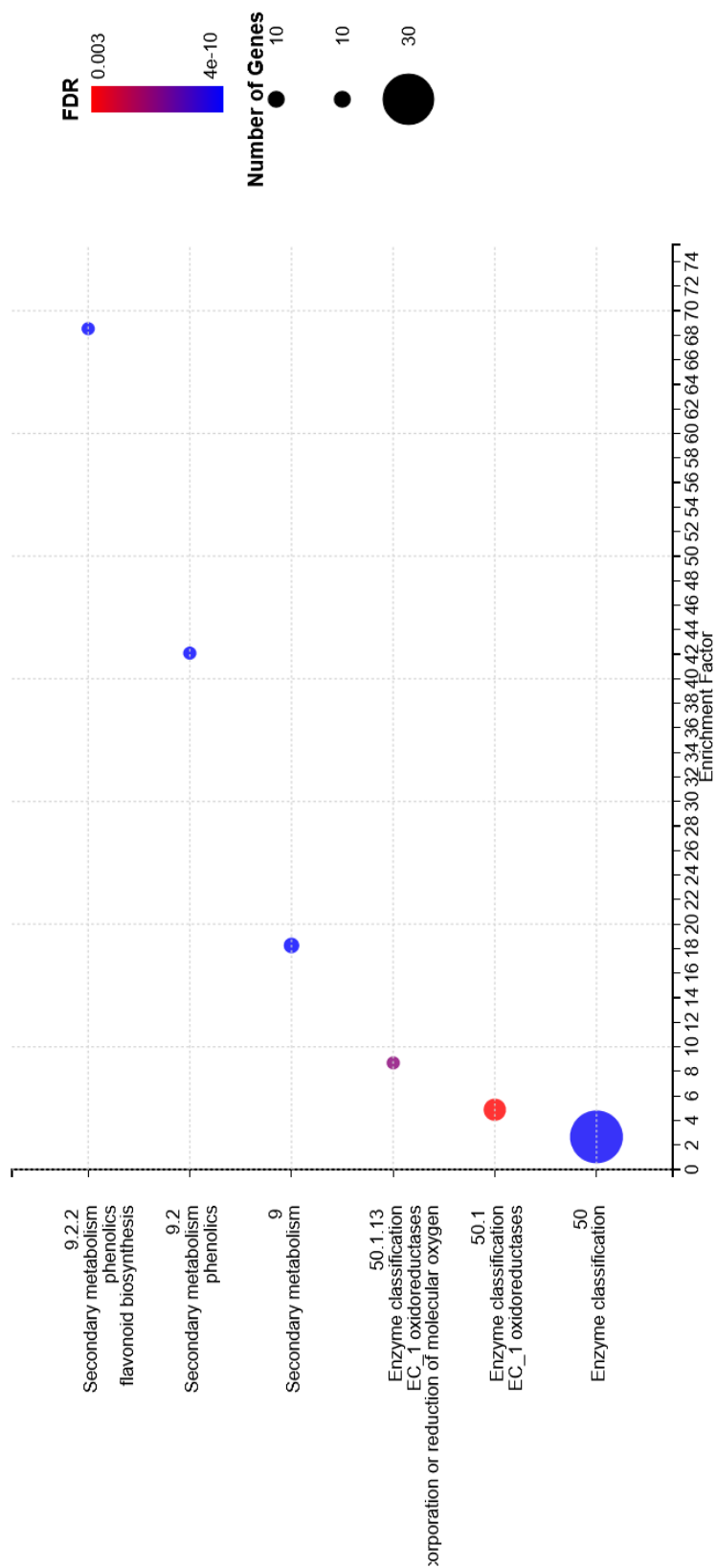


Abbildung 4.1.14 Ergebnis einer Mercator Anreicherungsanalyse für Gene, die im Salzstress durch Priming (CS vs. PS 24h) und spät durch Salzstress in ungeprimten Pflanzen induziert werden (CC vs. CS 8 Tage) Datenerhebung, -Analyse: Sara Beier, , Anika Wiese-Klinkenberg, Forschungszentrum Jülich. Darstellung: Mercator 4, https://www.plabipd.de/mercator_main.html

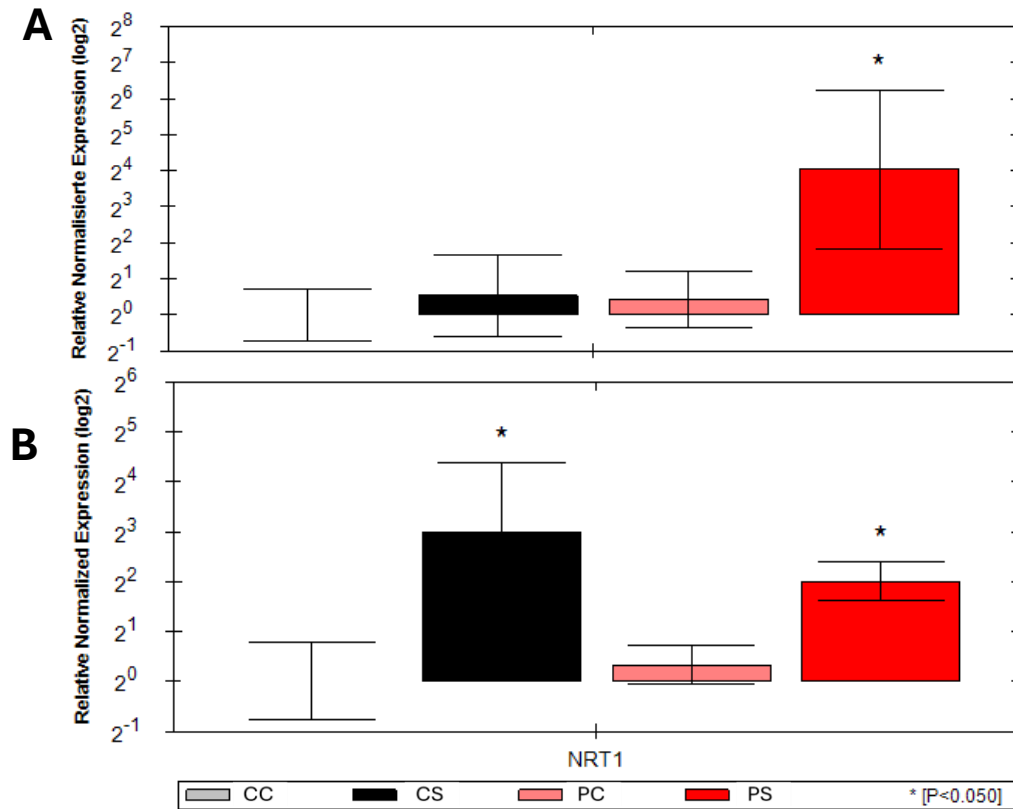


Abbildung 4.1.15: Expression von NRT1. A: Real time qPCR, relative normalisierte Log2-fache Expression nach 24 Stunden Salzstress, relativ zu CC, B: Real time qPCR, relative normalisierte Log2-fache Expression nach 8 Tagen Salzstress. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung, Sternchen zeigen signifikante Änderung zur Kontrolle CC mit $p \leq 0.05$ nach one-way ANOVA in der CFX-Maestro Software. $n=4$. Datenerhebung, -Analyse, und Darstellung: Sarah Spettmann, Sara Beier, Anika Wiese-Klinkenberg, Forschungszentrum Jülich

4.2. Ergebnisse zu Arbeitspaket 2: Priming gegen biotischen Stress/Schadorganismen (Universität Bayreuth, Partner 5, 2819NA125)

Das AP2 hat sich zum Ziel gesetzt, ein mögliches Kreuzpriming von Tomatenjungpflanzen in Antwort auf einer abiotischen Stress-Behandlung zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurde ein möglicher Schutz vor biotischen Stressfaktoren, wie pathogene Krankheitserreger, untersucht. Die Durchführung des AP2 wurde bedingt durch den Umzug der Projektleiterin vom Helmholtz Zentrum München an die Universität Bayreuth verzögert. Nach Verlagerung der Mittel an den neuen Standort, konnte die für das AP2 essenzielle Doktorandenstelle zum 01.02.23 besetzt werden. Im Vorfeld wurden mit Hilfe zweier Bachelorarbeiten, die im Jahr 2022 am Helmholtz Zentrum München durchgeführt wurden, erste Optimierungsversuche gestartet. In diesen Versuchen wurde festgestellt, dass das Gießen von Tomatenjungpflanzen, die auf Erde angezogen wurden, mit einer Salz-haltigen Lösung (50 mM NaCl), die Resistenz der Pflanzen gegen Infektionen mit *Alternaria alternata* sowie *Alternaria solani* erhöhte. Versuche die Salz-Konzentration runterzufahren waren weniger erfolgreich. Eine Behandlung von Tomatenjungpflanzen mit 15 mM NaCl führte in nur 1 von 4 Versuchen zum Erfolg, eine Behandlung mit 30 mM NaCl in 3 von 5 Versuchen, wohingegen eine Behandlung mit 50 mM NaCl in allen weiteren Versuchen zu einer erhöhten Resistenz gegen das genutzte Pilz-Pathogen führte. Der Zeitraum des Primings konnte auf mindestens 17 Tage nach der letzten Salzbehandlung festgelegt werden; es wurden Infektionen an 3, 17 und 31 Tagen nach der letzten Salzbehandlung durchgeführt. Das Salz-Priming führte zu kleineren Läsionen einer *Alternaria alternata*-Infektion im Vergleich zu ungeprimten Pflanzen, wenn die Infektion 3 oder 17 Tagen nach der letzten Salzbehandlung stattfand (Abb. 4.2.1). Aus diesen Versuchen konnten Proben für die Etablierung des Analyse-Pipelines im Bereich DNA-Methylierung im Rahmen von AP4 zur Verfügung gestellt werden.

Zu Beginn des AP2 im Jahr 2023 wurden die Priming-Bedingungen zunächst an den in AP1 optimierten Anwendungen angepasst (Partner 1) sowie in Rücksprache mit dem Praxisbeirat vermehrt anwendungsorientiert gestaltet. Letzteres passierte durch Nutzung von Steinwolle für die Anzucht von Tomatenjungpflanzen. Darüber hinaus wurde ebenfalls in Absprache mit Partner 1 ein Kälte-Priming als zusätzlicher Priming-Stress etabliert. Da eine Kälte-Behandlung bei 12 °C keinen Schutz gegen *A. alternata* erzeugte und die gleiche Kälte-Behandlung in Kombination mit einer Salz-Behandlung den durch die Salz-Behandlung ausgelösten Schutz nicht signifikant verstärkte, wurde für den restlichen Verlauf von AP2 auf eine alleinige Salz-Behandlung zurückgegriffen (siehe Material und Methoden für das AP2). Obwohl planmäßig zunächst mit *Alternaria solani* gearbeitet werden sollte, wurde es erforderlich auf dem sehr ähnlichen Pilz *A. alternata* zurückzugreifen.

Die Vergleichbarkeit der Ergebnisse wurde dadurch unterstützt, dass Saatgut für die Tomatensorte M82 im Konsortium geteilt wurde; so wurden von Partner 2 Samen für die Durchführung der Experimente in AP2 zur Verfügung gestellt. Da die Samenvermehrung der Tomatensorte M82 sich zeitaufwändig gestaltete, wurden alle weitere Versuchsansätze in AP2 zunächst in der Tomatensorte Moneymaker etabliert und anschließend in jeweils mindestens drei biologisch unabhängigen Replikaten in M82 durchgeführt. Damit verbundenen Genexpressionsanalysen sowie RNA-Sequenzierung wurden ausschließlich in M82 durchgeführt. Auch wurden ausschließlich erfolgreiche Experimente, in welchen einen durch das Salz-Priming

hervorgerufenen Schutz gegen einen pathogenen Krankheitserreger detektiert wurde, in der Anwendungsorte Adeleza validiert.

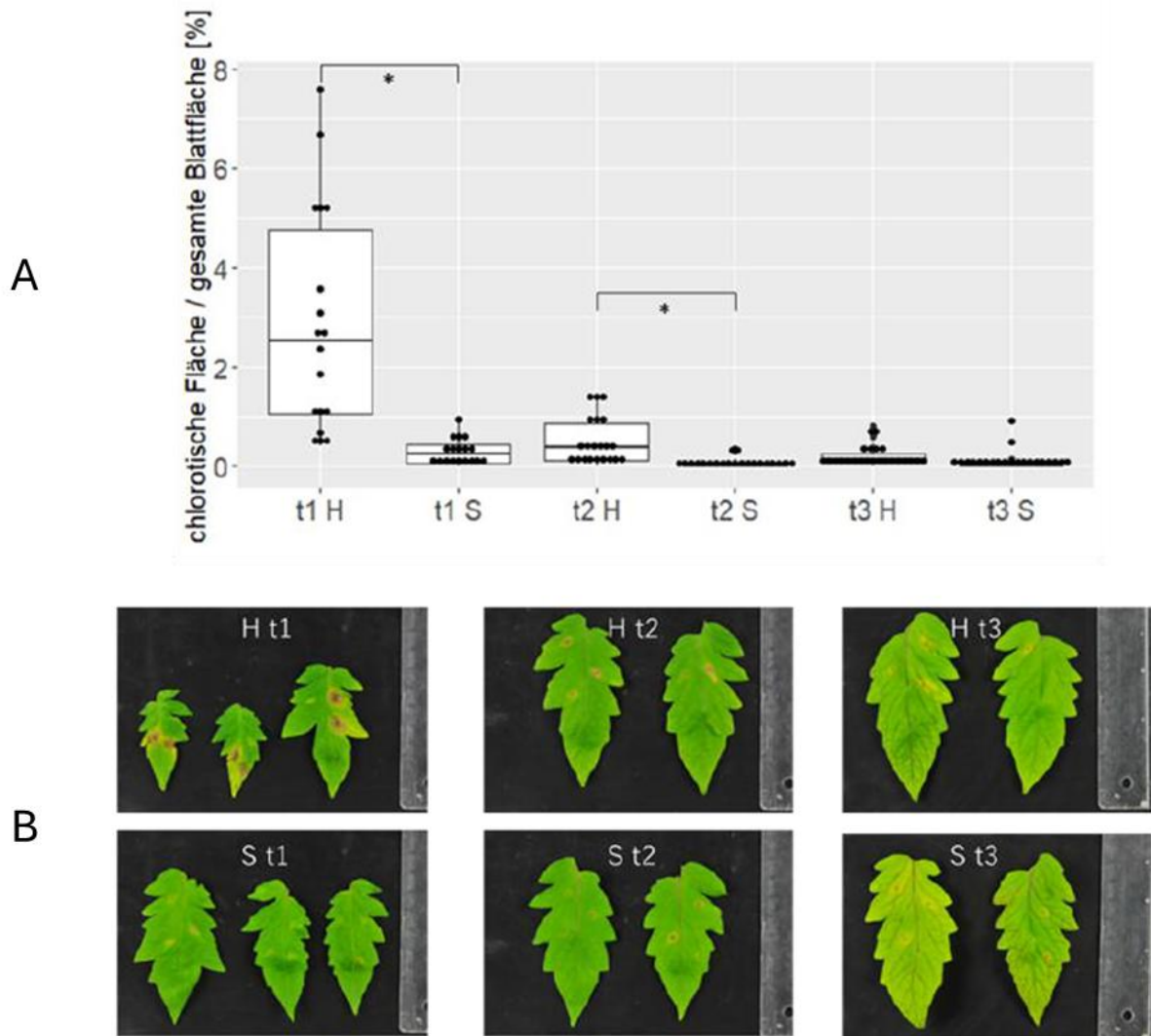


Abbildung 4.2.1: Effekt eines 30 mM NaCl-Primings auf die Abwehr gegen das nekrotrophe Pathogen *A. alternata* zu unterschiedlichen Infektionszeitpunkten nach der letzten NaCl-Behandlung. Infektionszeiten: t1 = 3-4 Tage (T), t2 = 17-18 T, t3 = 31-32 T nach der letzten NaCl-Behandlung. A) Abgebildet ist der Anteil der chlorotischen Fläche zur gesamten Blattfläche 7 dpi (days post inoculation) in % als Boxplot. Die mittlere Linie stellt den Median, die obere und untere Linie der Box das erste und dritte Quartil dar. Die Punkte zeigen die individuellen Läsionsgrößen einzelner Blätter von zwei durchgeführten Versuchen ($n = \text{Pflanzen} \times \text{Behandlung} \times \text{Wiederholungen}$; $nt_1 = 3 \times 2 \times 2$, $nt_2 = 4 \times 2 \times 2$, $nt_3 = 4 \times 2 \times 2$). Zu den Zeitpunkten t1 und t2 wurden signifikante Unterschiede zwischen NaCl-Behandelten (S) und unbehandelten Pflanzen (H) beobachtet (Welch two sample t-test, $p\text{-Wert} < 0.05$) B) Bilder von infizierten Blättern 7 dpi. Datenerhebung, -Analyse, und Darstellung: Haruna Gütlin, B.Sc. Agrar- und Gartenbauwissenschaften der Technischen Universität München am Helmholtz Zentrum München.

Salz-Priming induziert einen sortenabhängigen Schutz vor *A. alternata* aber nicht vor *B. cinerea* und *P. syringae*

Die Anwendung des optimierten Salz-Priming Verfahrens an der Tomatensorte M82 führte reproduzierbar zu einer erhöhten Resistenz der Tomatenpflanzen zu einer Infektion der Blätter mit *A. alternata* (Abb. 4.2.2A/B). Nach Anwendung des Salz-Priming Verfahrens blieben die von *A. alternata* verursachten Läsionen in allen Versuchswiederholungen kleiner als nach einer Kontroll-Behandlung ohne Salz. In der Tomatensorte Moneymaker reduzierte das Salz-Priming die *A. alternata* Vermehrung (gemessen anhand der Läsionsfläche) in lediglich ~50% der Experimente. Insgesamt zeigten die Experimente eine Sortenabhängige erhöhte Resistenz gegen *A. alternata* nach Salz-Priming, welche in der Tomatensorte M82 robust nachgewiesen wurde (Abb. 4.2.2B), dafür in der Sorte Moneymaker nicht signifikant war (Abb. 4.2.3A).

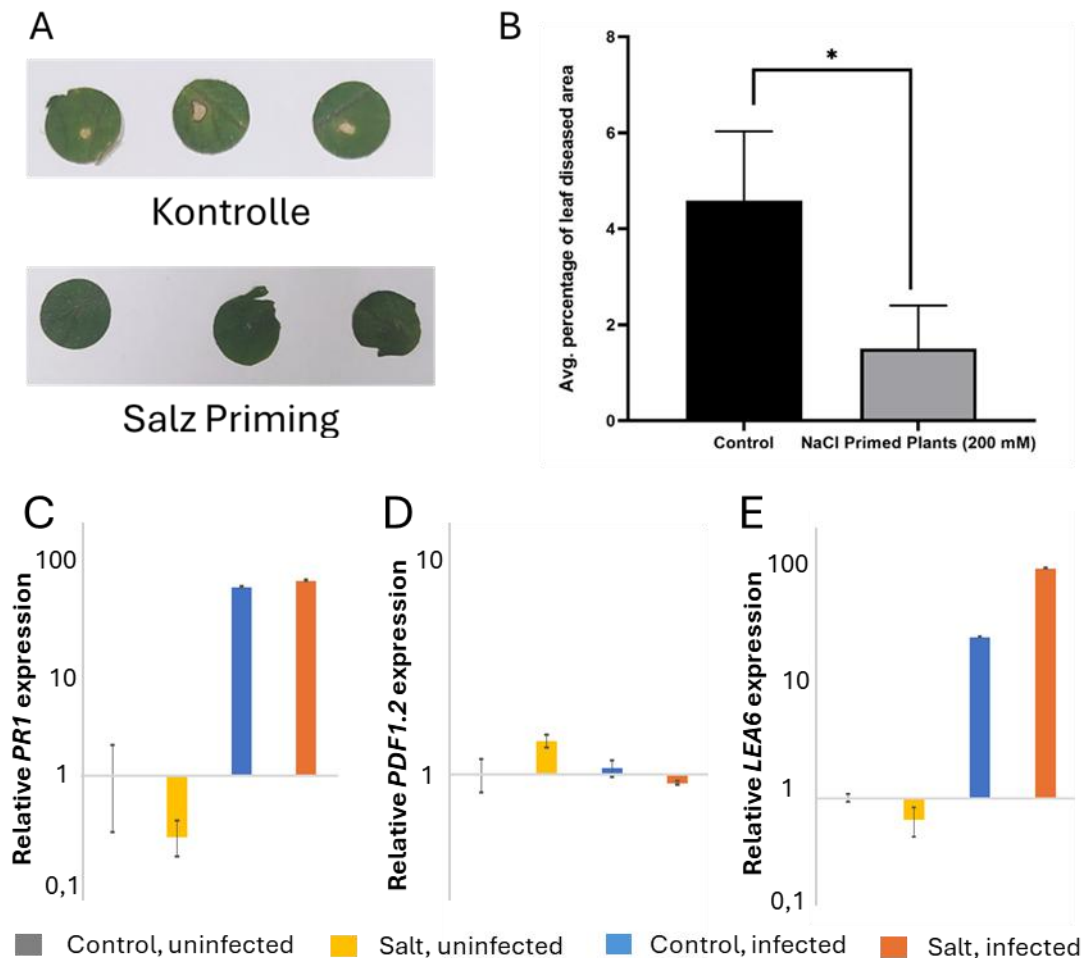


Abbildung 4.2.2: Salz-Priming schützt Tomatenjungpflanzen der Tomatensorte M82 vor *A. alternata* Befall im Blatt. 20-Tage alte Keimlinge wurden mit Salz behandelt (NaCl) oder einer entsprechenden Kontrolle unterzogen (control); nach einer anschließenden 10-tägigen Erholungsphase wurden Blätter der Pflanzen mit *A. alternaria* infiziert. A) *A. alternata* Läsionen auf Blattscheiben 7 dpi. B) Vergleich der relativen *A. alternata* Läsionsfläche pro Blattscheibe 7 dpi. Abgebildet sind Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung von drei Wiederholungen; * zeigt statistische Relevanz, Student's *t* Test, $p < 0,05$. C,D,E) Relative Transkript Akkumulation von PR1 (C), PDF1.2 (D) und LEA6 (E) am Tag, bzw. unmittelbar vor, der Infektion (uninfected) oder 24 Stunden nach der Infektion (infected). Die RT-qPCR-Daten wurden gegen den des Referenz-Gens ACTIN normalisiert; abgebildet sind Mittelwerte ($\pm$ Standardabweichung) der fold-change im Vergleich zu Kontrolle vor der Infektion (control, uninfected) von drei Wiederholungen. Datenerhebung und -Analyse: Samaneh Bagheri, Doktorandin, Universität Bayreuth

Sowohl *A. alternata* als auch *A. solani* sind Krankheitserreger mit einem nekrotrophen Lebensstil. Das heißt, dass diese Krankheitserreger ihre Wirtszellen töten, um sich von deren Inhaltstoffen zu ernähren, wobei die für solche Krankheiten charakteristischen Läsionen auf den befallenen Geweben entstehen (Abb. 4.2.2A). Diese Krankheitserreger werden in aller Regel durch vergleichbare Mechanismen in Abhängigkeit der Phytohormone Jasmonsäure und Abscisinsäure abgewehrt. Eine erhöhte Resistenz (z.B. durch Salz-Priming) gegen einen dieser Krankheitserreger lässt somit zu hoher Wahrscheinlichkeit Rückschlüsse über eine mögliche erhöhte Resistenz gegen den anderen Krankheitserreger zu. Ähnliches gilt für den ebenfalls nekrotrophen Krankheitserreger *Botrytis cinerea*, welcher im Projekt zur Überprüfung dieser Hypothese herangezogen wurde. Unerwarteterweise erwies sich das Salz-Priming in beiden genutzten Tomatensorten, M82 und Moneymaker, als ineffektives Schutzmittel gegen eine Infektion der Blätter mit *B. cinerea* (Abb. 4.2.3.B/C).

Neben Krankheitserregern mit einem nekrotrophen Lebensstil, werden in der Phytopathologie Krankheitserregern mit einem biotrophen oder hemi-biotrophen Lebensstil unterschieden. Hierzu gehört das bakterielle Pathogen *Pseudomonas syringae*. (Hemi-)biotrophen Krankheitserregern ernähren sich von lebenden Wirtszellen und werden in aller Regel durch einen anderen Mechanismus als nekrotrophen Krankheitserreger in Abhängigkeit von dem Phytohormon Salizylsäure abgewehrt. Interessanterweise agieren die pflanzlichen Abwehrmechanismen gegen nekrotrophen und (hemi-)biotrophen Krankheitserregern häufig antagonistisch. Wird also eine Pflanze resistenter gegen nekrotrophe Krankheitserreger, ist es möglich, dass sie gleichzeitig anfälliger für (hemi-) biotrophe Krankheitserreger wird. Da dieser Antagonismus bekannt ist, ihm aber durch Priming häufig entgegengewirkt wird, wurde im Projekt untersucht, ob das Salz-Priming einen positiven, negativen oder keinen Einfluss auf die Resistenz der Pflanzen gegen (hemi-) biotrophe Krankheitserreger hat.

In 4 Experimenten mit der Tomatensorte M82 konnte kein Unterschied in der Anfälligkeit gegen *P. syringae* zwischen Salz-behandelten und Kontroll-Pflanzen festgestellt werden (Abb. 4.2.3D). In 4 weiteren Experimenten mit dem Sorte Moneymaker waren die Ergebnisse uneindeutig; in 3 der Experimente wurde eine mögliche erhöhte Anfälligkeit für *P. syringae* in Salz-behandelten Pflanzen festgestellt, die sich aber nicht als signifikant erwies (Abb. 4.2.3E).

Insgesamt lässt sich schließen, dass das Salz-Priming Tomatenjungpflanzen der Sorte M82 vor Blattinfektionen mit dem Krankheitserreger *A. alternata* schützt, dieser Schutz aber sorten-abhängig erscheint und sich darüber hinaus nicht auf weiteren nekrotrophen sowie hemi-biotrophen Krankheitserreger übertragen lässt. Das Salz-Priming löste in 2 von 3 Versuchen mit der Anwendungssorte Adeleza eine verringerte Anfälligkeit für *A. alternata* aus (Abb. 4.2.3F). Somit lässt sich schlussfolgern, dass die Tomatensorten M82 und ggf. Adeleza aber nicht die Tomatensorte Moneymaker mit einer erhöhten Resistenz gegen *A. alternata* auf das Salz-Priming reagierten. In Pflanzen-Pathogen Interaktionen, bei denen keine Schutzwirkung des Salz-Priming festgestellt wurde, wurde ebenfalls keine erhöhte Anfälligkeit der Pflanzen für die getesteten Krankheitserreger festgestellt. Aus diesem Grund ist beim Salz-Priming von einem möglichen Vorteil (im Sinne der erhöhten Resistenz zu *A. alternata*) ohne wesentliche Nachteile im Bereich der Immunität (im vegetativen Wachstumsstadium der Pflanzen) bei der Anwendung des Salz-Priming auszugehen.

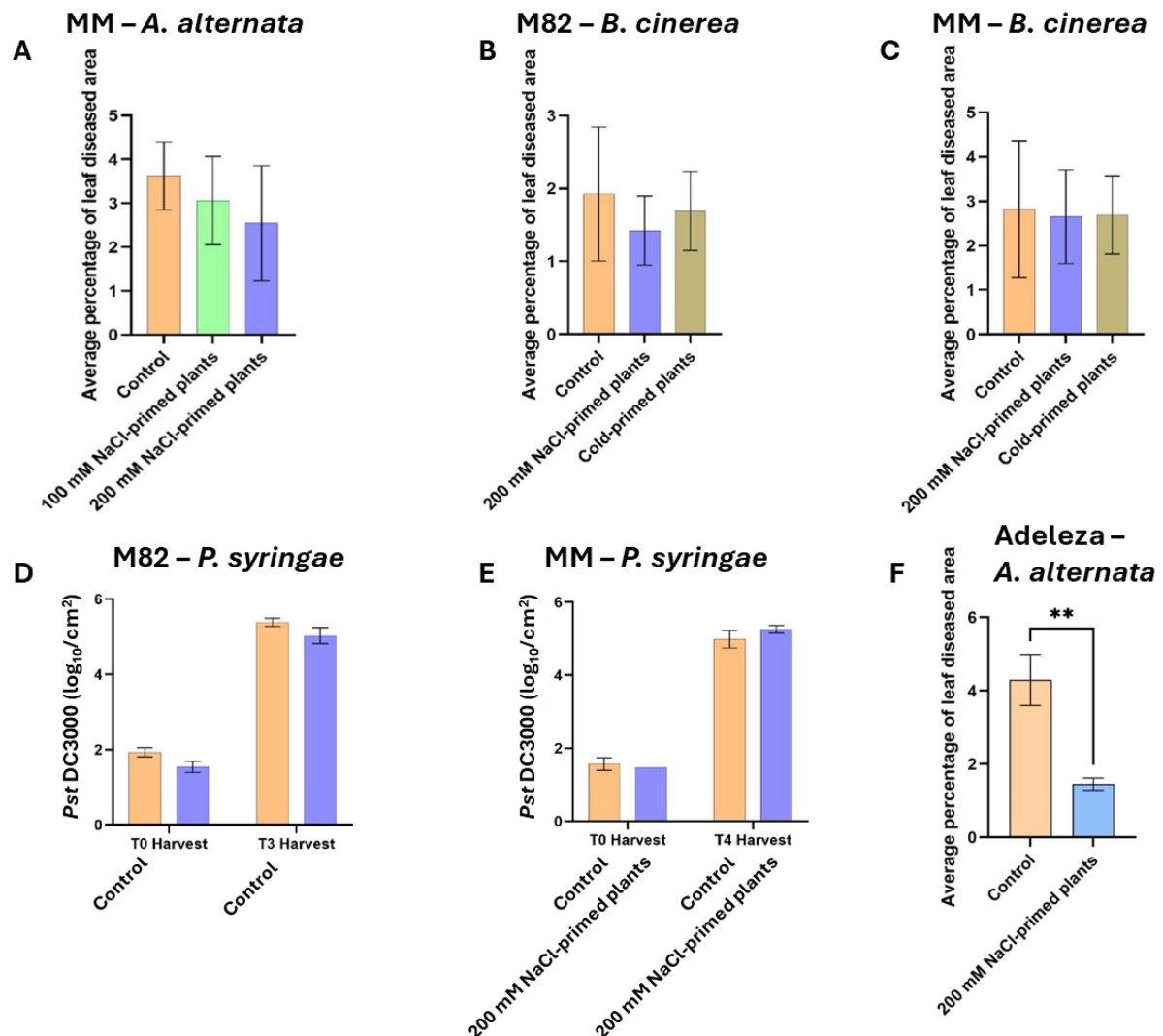


Abbildung 4.2.3: Effekte von Salz-Priming auf Infektionsverläufe der Krankheitserreger *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea* und *Pseudomonas syringae* in den Tomatensorten Moneymaker (MM) (A, C, E), M82 (B, D) und Adeleza (F). 20-Tage alte Keimlinge (für Adeleza: 15-Tage) wurden mit Salz behandelt (NaCl) oder einer entsprechenden Kontrolle unterzogen (Control); nach einer anschließenden 10-tägigen Erholungsphase wurden Blätter der Pflanzen mit *A. alternata* (A, F), *B. cinerea* (B, C) oder *P. syringae* (D, E) infiziert. In (B) und (C) wurde zusätzlich ein Kälte-Priming angewandt, wobei die Pflanzen zur gleichen Zeit anstatt Salz einer Kälte-Behandlung bei 12°C unterzogen wurden. A-C, F) Vergleich der durch *A. alternata* oder *B. cinerea* verursachten relativen Läsionsflächen pro cm^2 Blatt 7 dpi. Abgebildet sind Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung von drei Wiederholungen. D-E) *P. syringae* Titer pro cm^2 Blatt unmittelbar nach der Inokulation (T0) sowie 3 (T3) oder 4 Tage (T4) nach der Inokulation. Abgebildet sind Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung von drei Wiederholungen. A-E) Statistisch signifikante Unterschiede wurden auf Grund von ANOVA-Analysen oder Student's t Testverfahren ausgeschlossen. F) ** zeigt statistische Relevanz, Student's t Test, $p < 0,01$. Datenerhebung und -Analyse: Samaneh Bagheri, Doktorandin, Universität Bayreuth

Für Genexpressionsanalysen wurden aus jeweils drei biologisch unabhängigen Versuchen Daten zu der Expression der Genen *PR1* (als Marker für Salizylsäure/SA), *PDF1.2* (als Marker für Jasmonsäure/JA) und *LEA6* (responsiv auf abiotischen Stress/Abcisin Säure/ABA) erhoben. Interessanterweise konnte Partner 4 (Dr. Martin Groth, Helmholtz Munich) in Proben aus AP2.1 ein Gen der *LEA*-Familie, *LE25*, als potenziell differentiell methyliert identifizieren. Aus diesem Grund wurden sowohl *LE25* als auch das ABA Marker-Gen *LEA6* in RT-qPCR-Experimenten untersucht, wobei die Ergebnisse vergleichbar waren zwischen den beiden Genen.

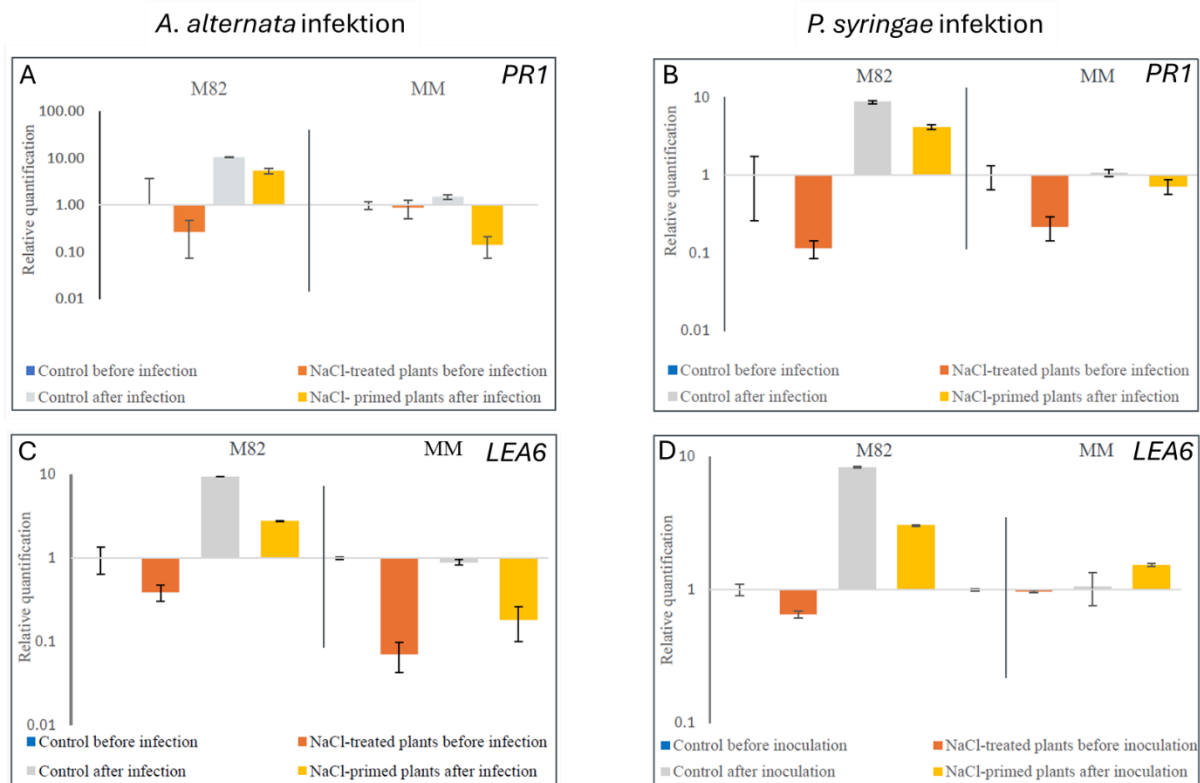


Abbildung 4.2.4: Gen Expressionsanalyse von PR1 (A, B) und LEA6 (C, D) in Tomatenpflanzen der Sorten M82 und Moneymaker (MM) vor und nach Infektion mit *Alternaria alternata* (A, C) und *Pseudomonas syringae* (B, D). 20-Tage alte Keimlinge wurden wie im Bericht beschrieben mit Salz behandelt (NaCl) oder einer entsprechenden Kontrolle unterzogen (control); nach einer anschließenden 10-tägigen Erholungsphase wurden Blätter der Pflanzen mit *A. alternata* oder *P. syringae* infiziert. Die Analyse der Transkriptakkumulation von PR1 und LEA6 erfolgte am Tag der Infektion (before infection) oder 24 Stunden nach der Infektion (after infection) mit Hilfe von RT-qPCR. Die qPCR-Daten wurden gegen den des Referenz-Gens ACTIN normalisiert; abgebildet sind Mittelwerte (+/- Standardabweichung) der fold-change im Vergleich zu Kontrolle vor der Infektion (control before infection) von drei Wiederholungen. Datenerhebung und -Analyse: Samaneh Bagheri, Doktorandin, Universität Bayreuth

Obwohl das Salz-Priming die Ausprägung von *A. alternata* Läsionen in der Tomatensorte M82 verringerte, aber keinen Einfluss auf die Ausprägung von *B. cinerea* Läsionen in der gleichen Tomatensorte hatte, wurden in M82 vergleichbare Expressionsprofile der SA, JA und ABA-Marker-Gene vor und nach Infektion mit den beiden Pathogenen festgestellt. Diese sind in Abb. 4.2.2.C-E sowie in Abb. 4.2.4.A/C für *A. alternata* beispielhaft dargestellt. Die Transkript-Akkumulation der beiden Genen PR1 und LEA6 reagierte nicht reproduzierbar auf die Salz-Behandlung, ging aber nach den jeweiligen Infektionen hoch (Abb. 4.2.2C/E und 4.2.4A/C). Ein Unterschied in der Ausprägung der Gen-Induktion in Abhängigkeit des Salz-Priming konnte nicht reproduzierbar festgestellt werden. Interessanterweise reagierte das JA-Marker-Gen PDF1.2 weder auf die Salz-Behandlung noch auf eine Infektion von M82 mit *A. alternata* (Abb. 4.2.2D) oder *B. cinerea*. Die Reaktion der entsprechenden Gene unterstützt eine ähnliche phytohormonelle Reaktion der Tomatenjungpflanzen auf *A. alternata* und *B. cinerea*, erklärt jedoch nicht, warum das Salz-Priming die Resistenz von M82 gegen *A. alternata* aber nicht gegen *B. cinerea* erhöht.

Die Gen-Reaktionen unterschieden sich auch in den Experimenten mit *P. syringae* minimal. Die Marker-Gene für SA und ABA, PR1 und LEA6, wurden – vergleichbar zu ihrer Reaktion auf *A. alternata* und *B. cinerea* – hochreguliert nach Infektion von Tomatenjungpflanzen der Sorte M82 mit *P. syringae* (Abb. 4.2.4B/D). Im Gegensatz zu den beiden anderen Krankheitserreger, führte

eine Infektion von M82 mit *P. syringae* darüber hinaus zu einer erhöhten Transkript-Akkumulation des JA-Markers *PDF1.2* (Abb. 4.2.5). Dies lässt auf eine unterschiedlichen phytohormonelle Reaktion der Pflanzen auf *P. syringae* im Vergleich zu *A. alternata* und *B. cinerea* schließen. Eine Reaktion auf das Salz-Priming wurde jedoch auch auf der Genexpressionsebene nach *P. syringae* Infektion nicht festgestellt.

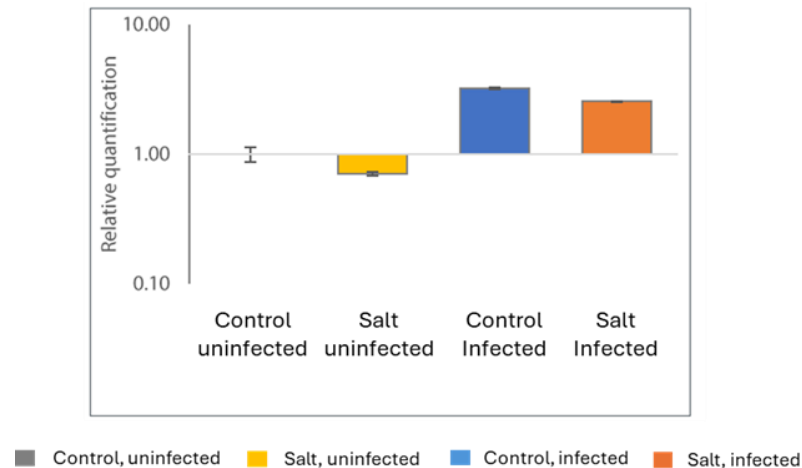


Abbildung 4.2.5: Gen Expressionsanalyse von *PDF1.2* in Tomatenpflanzen der Sorte M82 vor und nach Infektion mit *Pseudomonas syringae*. 20-Tage alte Keimlinge wurden wie im Bericht beschrieben mit Salz behandelt (NaCl) oder einer entsprechenden Kontrolle unterzogen (control); nach einer anschließenden 10-tägigen Erholungsphase wurden Blätter der Pflanzen mit *P. syringae* infiziert. Die Analyse der Transkript-Akkumulation von *PDF1.2* erfolgte am Tag, bzw. unmittelbar vor, der Infektion (uninfected) oder 24 Stunden nach der Infektion (infected) mit Hilfe von RT-qPCR. Die qPCR-Daten wurden gegen den des Referenz-Gens *ACTIN* normalisiert; abgebildet sind Mittelwerte (+/- Standardabweichung) der fold-change im Vergleich zu Kontrolle vor der Infektion (control uninfected) von drei Wiederholungen. Datenerhebung und -Analyse: Samaneh Bagheri, Doktorandin, Universität Bayreuth

Die hier beschriebene Gen Expressionsänderungen in M82 konnten in der Tomatensorte Moneymaker nicht festgestellt werden (Abb. 4.2.4); möglicherweise unterscheidet sich die Immunreaktion in M82 wesentlich von der in Moneymaker und dies erklärt den Unterschied in der Ausprägung des Salz-Priming als Schutz gegen *A. alternata* in diesen beiden Tomatensorten. Da die Phytohormon-Marker wenig aussagekräftig zu etwaigen molekularen Mechanismen des Salz-Priming in M82 gegen *A. alternata* waren, wurde des Weiteren auf eine RNA-Sequenzierung des Transkriptom der M82 Pflanzen nach Salz-Priming sowie vor und nach Infektion zurückgegriffen. Da das Salz-Priming nur in M82 und ausschließlich gegen *A. alternata* aktiv war, wurde die RNA-Sequenzierung auf diese Interaktion begrenzt.

Transkriptom-Analyse des Salz-Priming in M82 vor und nach Infektion mit *A. alternata*

Die RNA-Sequenzierung von Proben der Tomatensorte M82 wurde für den Vergleich der Genexpressionsprofile mit und ohne Salz-Priming, jeweils vor und nach Infektion der Pflanzen mit *A. alternata*, durchgeführt. Beim Priming sind die Erst-Reaktionen auf die Priming-Behandlung, in diesem Experiment das Salz-Priming, häufig zeitlich begrenzt und nach der Erholungsphase kaum noch nachweisbar. Unsere Analyse zeigte insgesamt nur 15 differenziell regulierten Genen (DEGs) in Antwort auf die Salz-Behandlung (Vergleich sagt, uninfected vs. Control, uninfected; Abb. 4.2.6). Von diesen 15 Genen erwiesen sich 11 in einem Expressionsbereich nahe Hintergrund, so dass von Artefakten auszugehen wäre; lediglich 4 Gene außerhalb dieses Bereichs schienen auf dem Salz zu reagieren (Abb. 4.2.7A). Es ist davon auszugehen, dass die 10-

tägige Erholungsphase nach der Salz-Behandlung wesentlich zu der Eingrenzung der Anzahl DEGs in Antwort auf das Salz-Priming beigetragen hat.

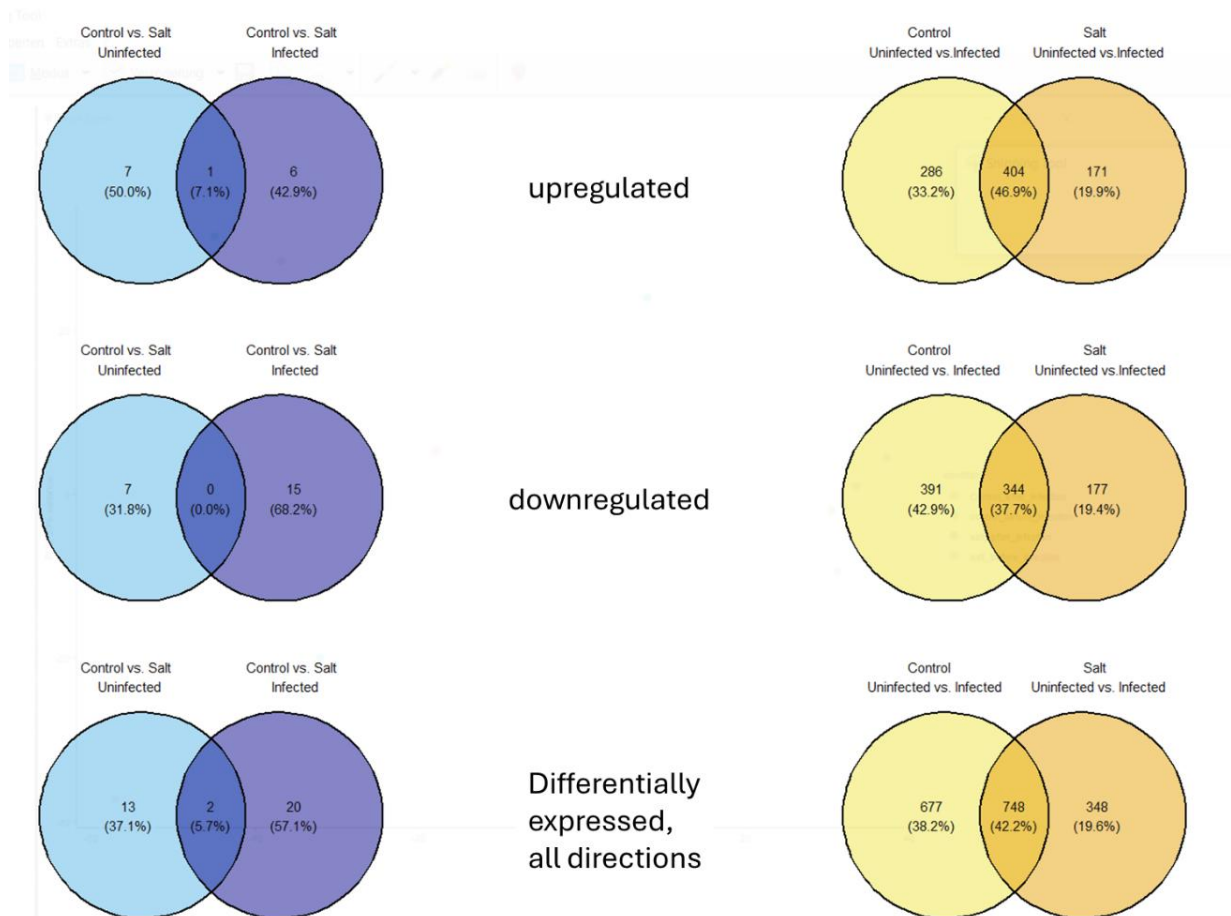


Abbildung 4.2.6: VENN-Diagramme der differenziell regulierten Genen nach RNA-Seq Analyse. 20-Tage alte Keimlinge wurden wie im Bericht beschrieben mit Salz behandelt (Salt) oder einer entsprechenden Kontrolle unterzogen (Control); nach einer anschließenden 10-tägigen Erholungsphase wurden Blätter der Pflanzen für Genexpressionsanalyse geerntet (uninfected), sowie Blätter weiterer Pflanzen mit *A. alternata* infiziert. Letztere wurden 24 Stunden nach der Inokulation für die Genexpressionsanalyse nach Infektion (infected) geerntet. Die Anzahl der differenziell regulierten Gene werden hier gruppenweise verglichen für hochregulierte (upregulated), runterregulierte (downregulated) oder regulierte (gesamt: differentially expressed, all directions) Gene. Datenerhebung und -Analyse: Dr. Anna Sommer, wissenschaftliche Mitarbeiterin, Universität Bayreuth

Die *A. alternata* Infektion löste eine erheblich höhere Anzahl Genexpressionsänderungen aus, insgesamt 1.425 in der Gruppe *control, infected* (ohne Salz-Priming), davon wurden 690 Gene induziert und 735 inhibiert (Abb. 4.2.6). In der Gruppe *salt, infected* (*A. alternata* Infektion in Kombination mit Salz-Priming) wurden insgesamt 1.096 Gene durch die Infektion differenziell reguliert, davon wurden 575 Gene induziert und 521 inhibiert (Abb. 4.2.6). Insgesamt scheint somit die Reaktion der Tomatenjungpflanzen auf *A. alternata* zwar deutlich vorhanden, jedoch durch das Salz-Priming weniger ausgeprägt zu sein, was zum Teil auch eine Folgereaktion der weniger ausgeprägten Infektionslage der Salz-geprimten Pflanzen widerspiegeln könnte. Aus den Venn-Diagrammen in Abb. 4.2.6 geht aber auch klar ein quantitativer Unterschied in den DEGs hervor, wobei jeweils 677 und 348 Gene ausschließlich in Kontroll- respektive Salz-geprimten Pflanzen auf die *A. alternata* Infektion reagierten. Dieser quantitative (inhärent auch qualitative) Unterschied in den Gen-Reaktionen auf *A. alternata* in Abhängigkeit des Salz-Primings stellt das

Auslösen einer richtigen Priming-Reaktion durch die Salz-Behandlung als Grundlage für die verbesserte Immunität gegen *A. alternata* unter Beweis.

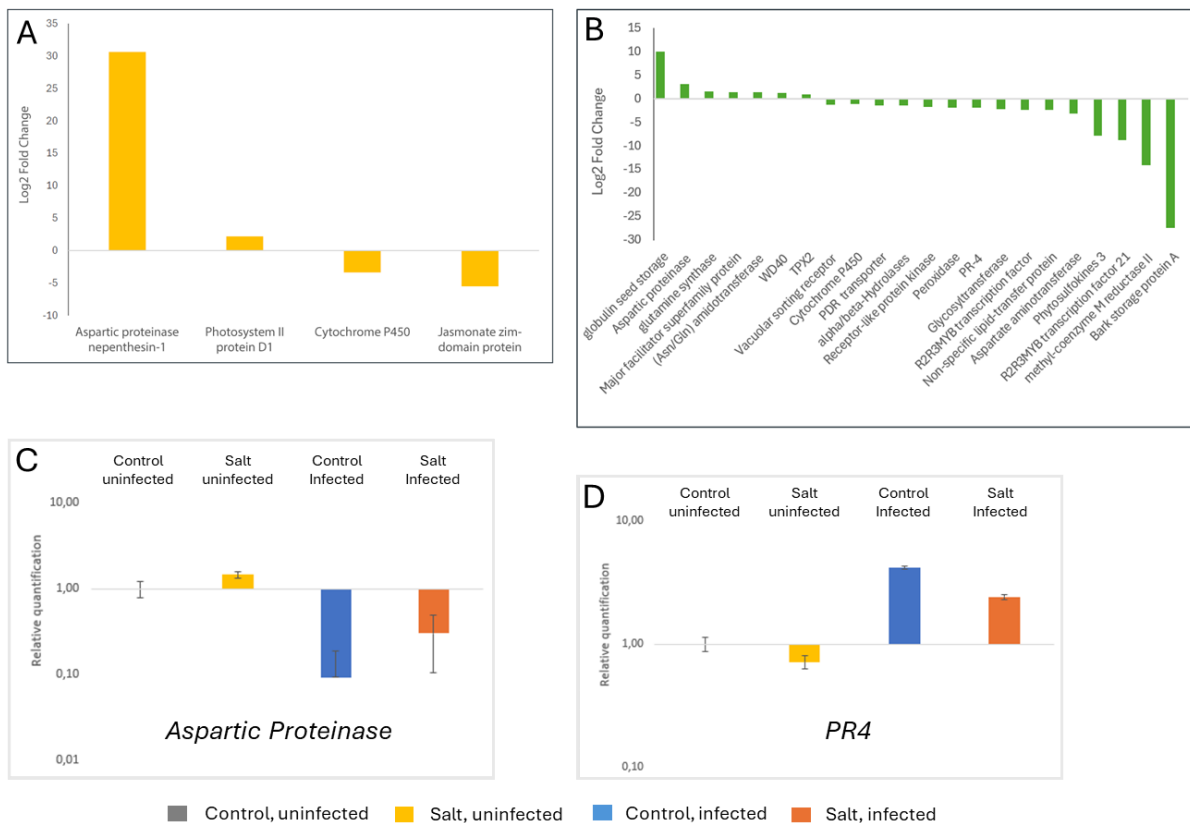


Abbildung 4.2.7: Differenziell regulierte Gene nach RNA-Seq Analyse und deren Validierung mit RT-qPCR. 20-Tage alte Keimlinge wurden wie im Bericht beschrieben mit Salz behandelt (Salt) oder einer entsprechenden Kontrolle unterzogen (Control); nach einer anschließenden 10-tägigen Erholungsphase wurden Blätter der Pflanzen für Genexpressionsanalyse geerntet (uninfected), sowie Blätter weiterer Pflanzen mit *A. alternata* infiziert. Letztere wurden 24 Stunden nach der Inokulation für die Genexpressionsanalyse nach Infektion (infected) geerntet. A) Differenziell regulierte Gene in Antwort auf dem Salz-Priming (salt, uninfected vs. control, uninfected); log2-fold change stellt die per RNA-Seq ermittelte Änderung dar. B) Priming-assoziierte differenziell regulierte Gene, welche sich in ihrer Expression nach Infektion in Abhängigkeit vom Salz-Priming ändern (salt, infected vs. control, infected); log2-fold change stellt die per RNA-Seq ermittelte Änderung dar. C, D) Die Transkript-Akkumulation von ASPARTIC PROTEINASE (C) und PR4 (D) wurde per RT-qPCR ermittelt in Proben aus weiteren, biologischen Replikaten des oben beschriebenen Versuchsablaufs. Die qPCR-Daten wurden gegen den des Referenz-Gens ACTIN normalisiert; abgebildet sind Mittelwerte (+/- Standardabweichung) der fold-change im Vergleich zu Kontrolle vor der Infektion (control uninfected) von drei Wiederholungen. Datenerhebung und -Analyse: Samaneh Bagheri, Doktorandin, Universität Bayreuth

Die spezifische Gen-Reaktion auf *A. alternata* in Abhängigkeit des Salz-Priming wurde mit Hilfe der Vergleichsgruppe *salt, infected* vs. *control, infected* untersucht. Hier wurden insgesamt 22 DEGs als geprimte Gene identifiziert, alle in einem Expressionsbereich oberhalb des Hintergrunds (Abb. 4.2.7B). Die meisten dieser DEGs, insgesamt 15 Gene, wurden inhibiert.

Es wurde ein Gen identifiziert, welches sowohl auf die Salz-Behandlung reagierte als auch eines der 22 geprimte Gene darstellte (Abb. 4.2.6). Eine RT-qPCR Validierung dieses Gens bestätigte eine mögliche Erhöhung der Transkript-Akkumulation eines ASPARTIC PROTEINASE in Antwort auf Salz (Abb. 4.2.7C). Auch wurde eine mögliche Erhöhung der Transkript-Akkumulation im direkten Vergleich *salt, infected* vs. *control, infected* bestätigt, wenn auch die Transkripte nach

der Infektion deutlich weniger detektiert wurden als vorher. Jedoch war die Reprimierung nach der *A. alternata* Infektion in den Salz-Priming Pflanzen weniger ausgeprägt als in den Kontroll-Pflanzen, wodurch eine scheinbare Erhöhung nach der Infektion in Abhängigkeit von der Salz-Behandlung vorlag. Umgekehrt wurde die Transkript-Akkumulation des *PR4* Gens durch die *A. alternata* Infektion stark erhöht, allerdings war diese Erhöhung in den Salz-geprimte Pflanzen weniger ausgeprägt als in den Kontroll-Pflanzen, was eine scheinbare Unterdrückung der Genexpression von *PR4* nach Infektion in Abhängigkeit des Salz-Priming schließen ließ (Abb. 4.2.7B/D).

Insgesamt lässt sich schlussfolgern, dass das Salz-Priming eine richtige Priming-Reaktion auslöst, welche Tomatenjungpflanzen der Sorten M82 (und ggf. Adeleza) vor einer Blatinfektion mit *A. alternata* schützt. Diese Priming-Reaktion geht mit quantitativen und auch qualitativen Unterschieden der Genreaktionen von M82 auf *A. alternata* einher.

Langzeit-Experiment: Effekte des Salz-Priming auf Tomatenfrüchte

Abschließend wurde im Rahmen des AP2 geklärt, inwiefern das Salz-Priming die Tomatensorte M82 noch im Fruchtstadium ggf. vor Infektionen schützt. Zu diesem Zweck wurden Tomatenpflanzen nach dem Salz-Priming in ein passiv gekühltes Gewächshaus transferiert und über mehreren Wochen bonitiert. Es wurden keinerlei Unterschiede im Pflanzenwachstum (Höhe) und Blüten- bzw. Fruchtstellung (Anzahl der Blüten und Früchte) in Abhängigkeit des Salz-Priming festgestellt. Reife Früchte wurden geerntet und mit *A. alternata* infiziert. In zwei biologisch unabhängigen Versuchen mussten wir feststellen, dass das Salz-Priming die Anfälligkeit der M82 Früchte für *A. alternata* zu erhöhen scheint (Abb. 4.2.8). Dieser Versuch wird zur Bestätigung des Ergebnisses im Laufe des Jahres 2025 wiederholt; die Wachstumsparameter der Pflanzen werden in den Versuchsabläufen mit einem semi-automatisierten Phänotypisierungsgerät festgehalten.

Dennoch wäre zum aktuellen Zeitpunkt zu schlussfolgern, dass das Salz-Priming zwar nicht mit Einbußen des Pflanzenwachstums oder -ertrags einherzugehen scheint, jedoch möglicherweise die Immunität der Früchte gegenüber *A. alternata* einschränkt.



Abbildung 4.2.8: *A. alternata* Läsionen auf M82-Früchte im Langzeit-Experiment. Links: Kontrolle, Rechts: Tomate einer Salz-Priming Pflanze. Datenerhebung und -Analyse: Samaneh Bagheri, Doktorandin, und Carina Heuschmann, technische Assistentin, Universität Bayreuth

4.3. Ergebnisse zu Arbeitspaket 3: Priming und Priming-Effekte während der Fruchtproduktion (Hochschule Geisenheim, 2819NA123)

Das Ziel in AP3 ist die Etablierung eines Primingprotokolls an Jungpflanzen sowie eine Erfassung der Pflanzenentwicklung und Ertrags- sowie Qualitätsbildung bei Folgestressbedingungen im gewachsenen Pflanzenbestand. Als geeignetes Stressprotokoll des Hitze-Primings erwies sich an der Sorte ‚Adeleza‘ eine tägliche 90-minütige Hitzeanwendung von 40 °C über eine Dauer von 7 Tagen in Klimakammern an 7 Tage alten Tomatenkeimlingen: Der positive Effekt von 90 min gegenüber 45 min bzw. 180 min Primingdauer spiegelte sich insbesondere durch eine höhere (Wachstums-)Fitness hinsichtlich hoher Pflanzenhöhe (Abb. 4.3.1A) und einer höheren Blattanzahl (Abb.4.3.1B) sowie Biomasseakkumulation (Abb. 4.3.1C) wider (Experiment 2). Zudem wurden die Anzahl der Blütenstände bei der 90minütigen Hitze-Primingdauer initial signifikant erhöht (Abb. 4.3.1D) (Körner et al. 2024b).

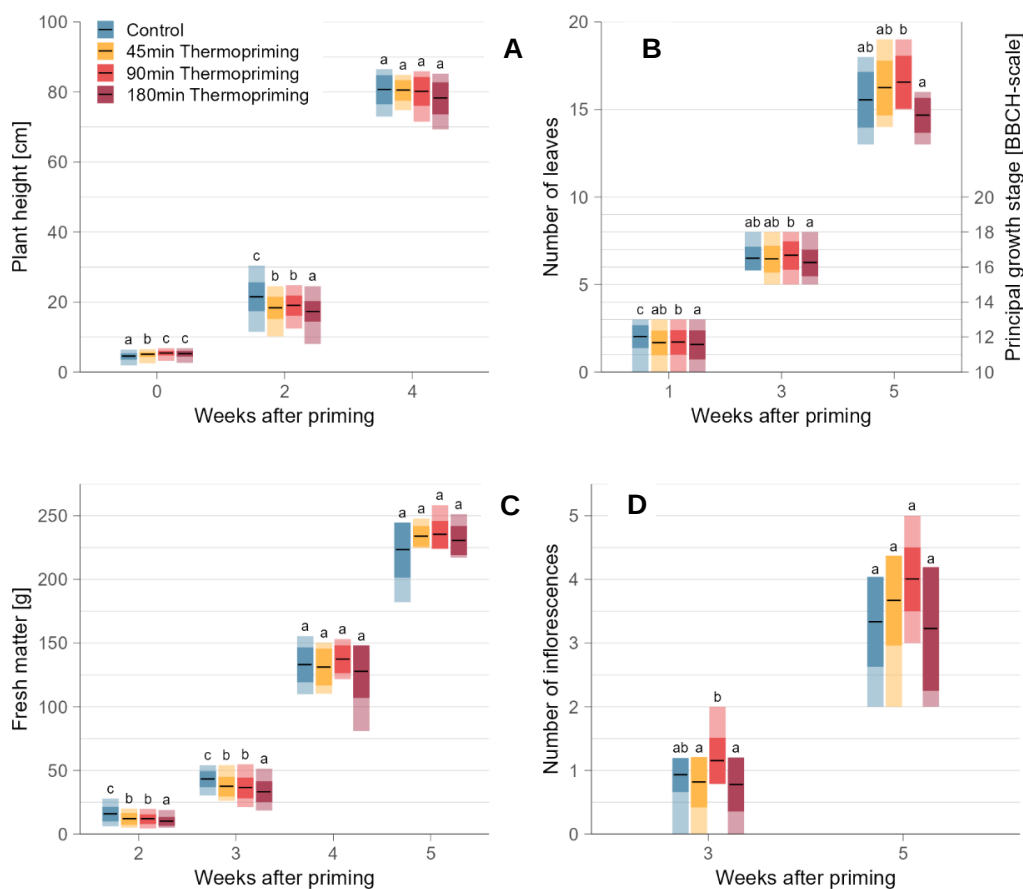


Abb.4.3.1: Wachstumsparmeter, dargestellt durch den Mittelwert (schwarze horizontale Linie), die Standardabweichung (intensiv gefärbtes inneres Kästchen) sowie das Maximum und Minimum (leicht gefärbtes äußeres Kästchen) der Tomatenpflanzen, zusammengefasst für drei experimentelle Sätze in Wochen nach der Priming-Behandlung, differenziert nach den vier Behandlungen: Kontrolle, 45 Minuten, 90 Minuten und 180 Minuten Thermopriming. (a) Pflanzenhöhe, gemessen vom Boden bis zum Triebspitze; (b) Anzahl der Blätter und BBCH-Entwicklungsstadium; (c) Frischmasse, (d) Anzahl der Blütenstände. Die unterschiedlichen Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede (ANOVA und EMMs Post-hoc; $\alpha = 0,05$) zwischen den Gruppen in derselben Woche nach der Priming-Behandlung an in Experiment 2. Die dargestellten Daten jedes Zeitpunkts wurden für alle drei Sätze zusammengefasst. In allen Sätzen betrug die ursprüngliche Stichprobengröße nach der Priming-Behandlung $n = 45$ Pflanzen pro Behandlung. Im ersten Satz wurden wöchentlich $n = 9$ Proben pro Behandlung für 5 Wochen nach Priming entnommen, während im zweiten und dritten Satz wöchentlich $n = 15$ Proben pro Behandlung für 3 Wochen nach Priming entnommen wurden. Datenerhebung, -Analyse, und Darstellung: Tobias Körner, Hochschule Geisenheim.

Insbesondere bei der 90-minütigen Behandlung wurde ein vorübergehender Anstieg des Flavonol-Index deutlich, der bei alten Blättern (Abb. 4.3.2A) auf eine frühe signifikante und bei jungen Blättern (Abb. 4.3.2B) auf eine tendenzielle Anreicherung epidermaler Flavonole innerhalb der ersten Woche nach Hitze-Priming hinwies.

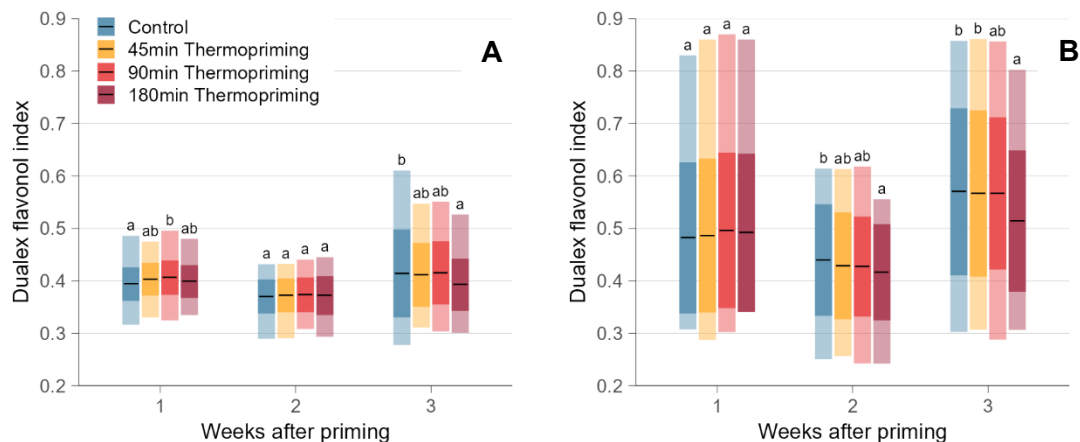


Abb.4.3.2: Flavonol-Indizes, dargestellt durch den Mittelwert (schwarze horizontale Linie), die Standardabweichung (intensiv gefärbtes inneres Kästchen) sowie das Maximum und Minimum (leicht gefärbtes äußeres Kästchen) der Tomatenpflanzen, zusammengefasst für drei experimentelle Sätze Wochen nach der Priming-Behandlung in (A) adulten und (B) jungen Blättern, differenziert nach den vier Behandlungen: Kontrolle, 45 Minuten, 90 Minuten und 180 Minuten Thermopriming in Experiment 2. Die unterschiedlichen Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede (ANOVA und EMMs Post-hoc; $\alpha = 0,05$) zwischen den Gruppen in derselben Woche nach der Priming-Behandlung an. Die dargestellten Daten jedes Zeitpunkts wurden für alle drei Sätze zusammengefasst. In allen Sätzen betrug die ursprüngliche Stichprobengröße nach der Priming-Behandlung $n = 45$ Pflanzen pro Behandlung. Im ersten Satz wurden wöchentlich $n = 9$ Proben pro Behandlung für 5 Wochen nach Priming entnommen, während im zweiten und dritten Satz wöchentlich $n = 15$ Proben pro Behandlung für 3 Wochen nach Priming entnommen wurden. Datenerhebung, -Analyse, und Darstellung: Tobias Körner, Hochschule Geisenheim.

Nach zwei Wochen war dieser Effekt nicht mehr nachweisbar, und bei der intensiveren 180-minütigen Behandlung war der Flavonol-Index in jungen Blättern signifikant reduziert (Abb. 4.3.3B). Die Konzentration von Chlorophyllen, Carotinoiden und Gesamtphenolen wurden durch Hitze-Priming nicht beeinflusst, wobei längere Behandlungen (180 min) zu einer Abnahme dieser Inhaltsstoffe in jungen Blättern führten. Anhand einer multifaktoriellen Analyse (MFA) wurden innerhalb des Datensatzes verschiedene Variablen (Messmethoden) miteinander korreliert, um gemeinsame Gruppen und damit die Auswirkungen in Bezug auf die Behandlungen, Hitze-Priming und/oder Folgestress, visuell darzustellen. Es zeigte sich, dass Hitze-Priming deutliche Effekte auf die Anreicherung sekundärer Metabolite in Blättern hatte. Besonders die Konzentrationen von Flavonoiden und phenolischen Verbindungen trugen maßgeblich zur Variation zwischen den Behandlungsgruppen bei (Abb. 4.3.3A). Dabei zeigten sich die 45- und 90-minütigen Behandlungen als gegensätzlich zur Kontrolle positioniert, was auf spezifisch differenzierte Reaktionen der Pflanzen auf diese Behandlungen hindeutete (Abb. 4.3.3B). Die Analyse ergab, dass unterschiedliche Messmethoden – sowohl invasive als auch nicht-invasive – aufgrund technischer Faktoren (z.B. dem analysierten Blattbereich und -dicke) teilweise divergierende Ergebnisse lieferten, in Kombination allerdings signifikante Muster hinsichtlich der Wirkung des Hitze-Primings aufzeigten.

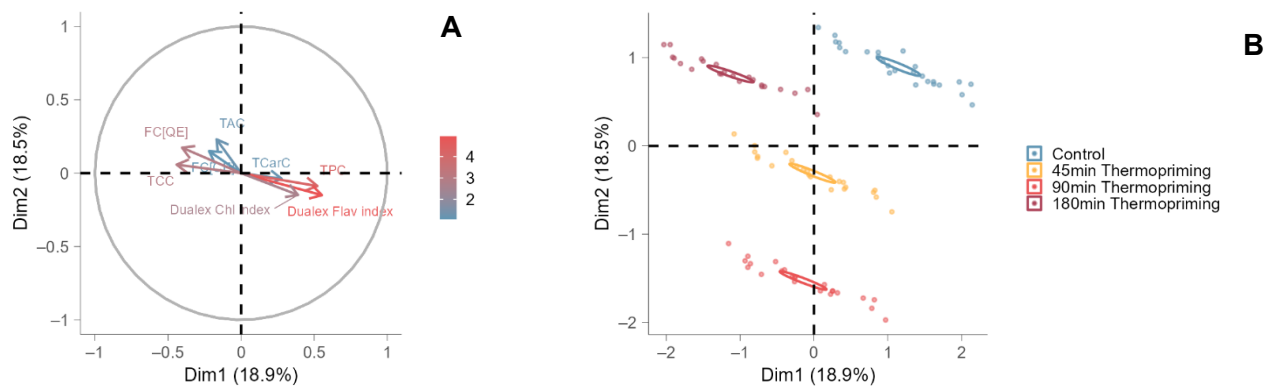


Abb.4.3.3: Multifaktorielle Analyse standardisierter primärer und sekundärer Blattinhaltsstoffe (TCC: Gesamter Chlorophyllgehalt; TCarC: Gesamter Carotinoidgehalt; TAC: Gesamter Anthocyanengehalt; TPC: Gesamtphenolgehalt; FC: Flavonoidgehalt (ausgedrückt als CE, Catechin-Äquivalente, oder QE, Quercetin-Äquivalente); Chlorophyll-(Chl)-Index; Flavonol-(Flav)-Index) für Gruppenmittelwerte (spezifiziert nach Behandlung, Blattalter, Datum und Satz; dargestellt als Punkte in (B) und die vier Behandlungen (dargestellt als Konfidenzellipsen in (b), $\beta = 0,95$) in Experiment 2: Kontrolle, 45 Minuten, 90 Minuten und 180 Minuten Thermopriming. Die multifaktorielle Analyse wurde auf die aktive Variable „Behandlung“ sowie auf die Zusatzvariablen „Blattalter“, „Datum“ und „Satz“ angewandt. Der Farbverlauf in (A) zeigt den Beitrag der Variablen zu den Dimensionen (Dim) an. Datenerhebung, -Analyse, und Darstellung: Tobias Körner, Hochschule Geisenheim.

Ebenso zeigte die Sorte ‚Brioso‘ (Vorversuch 1) durch ein 90 minütiges Hitze-Priming induzierte Anreicherung protektiver Blattinhaltsstoffe unter einem gleichgearteten Hitze-Folgestress: Die Laboranalyse belegte, dass Blätter geprimter Pflanzen unter nachfolgendem Hitzestress erhöhte Anthocyanengehalte aufwiesen, der Chlorophyllgehalt in den Blättern blieb dabei unverändert (Röhlen-Schmittgen et al. 2023).

Zur **Erfassung der Ertragsleistung und Fruchtqualität der Produktionssorte ‚Adeleza F1‘** wurde ein praxisnaher Anbauversuch im Gewächshaus durchgeführt, um das in Topfkultur etablierte Hitze-Priming mit einem Salz-Folgestress zu kombinieren und die Auswirkungen auf die generative Entwicklung von Pflanzen (kultiviert in Substratdämmen) zu erfassen (Abb. 4.3.4).



Abb. 4.3.4: Pflanzung von Tomaten in Substratdamm im Gewächshaus des Instituts für Gemüsebau, Hochschule Geisenheim, zum Zeitpunkt der Pflanzung im April 2022 (A, B) und (C) zum Ende der Kultur im Juni 2023. Bilder: Tobias Körner, Hochschule Geisenheim.

Dabei wurden nach Akklimatisierung im Gewächshaus (im Experiment 1) eine Behandlung mit Benzothiadiazol (BTH) als Positivkontrolle zur systemischen Pflanzenabwehraktivierung durchgeführt und in Interaktion mit einem nachfolgenden Salzstress (200 mM NaCl Lösungsgabe) gesetzt (Körner et al. 2024c). Die BTH Dosis erfolgte nach (Molinari and Baser 2010).

Unter Einbezug i) vegetativer Parameter, u.a. die Überlebensrate der Tomatenpflanzen nach dem Priming, Entwicklungsstadien, Pflanzenhöhe, relative Wachstumsrate (bezogen auf die Pflanzenhöhe), Blattanzahl, Anzahl an Blüten- und Fruchtständen, sowie ii) inhaltsstofflich Chlorophyll- und Flavonol-Index mittels Fluoreszenz-basierter Sensoren, und iii) den Fruchtertrag ergaben sich folgende Erkenntnisse:

- Hitze-Priming führte anschließend unmittelbar zu einem Anstieg der Pflanzenhöhe (+46 %), gefolgt von einer Reduktion in den darauffolgenden Wochen (bis zu -12 %; Abb. 4.3.5A). Auch nach der Behandlung mit Benzothiadiazol (BTH) blieben die Hitze geprimten Pflanzen im Vergleich zu unbehandelten oder nur mit BTH behandelten Pflanzen kleiner (-7 %). Der anschließende Salzstress beeinflusste diesen Trend nicht, und geprimte Pflanzen zeigten durchgehend eine verringerte Höhe und kürzere Internodienlänge (-7 %) im Vergleich zur ungeprimten Kontrollgruppe.
- Die relative Wachstumsrate (RGR) der geprimten Pflanzen war anfänglich erhöht (+50 %), nahm jedoch nach zwei Wochen ab (-8 %; Abb. 4.3.5B). Im weiteren Verlauf stieg die RGR wieder an, wobei BTH keinen Einfluss zeigte. Nach dem Salzstress gab es keine Unterschiede in der RGR zwischen den Behandlungen.
- Das vegetative Wachstum wurde nach dem anfänglich gesteigerten Streckungswachstum durch das Hitze-Priming in den folgenden Wochen verzögert, wobei geprimte Pflanzen vorübergehend mehr Blätter aufwiesen, was auf eine zeitweise beschleunigte Entwicklung hindeutete. Ab der vierten Woche glichen sich diese Unterschiede aus, wobei BTH-behandelte Pflanzen vorübergehend eine geringere Blattanzahl aufwiesen.
- Die generative Entwicklung wurde durch Hitze-Priming zunächst gehemmt, ersichtlich anhand der geringeren Anzahl an Blütenständen pro Pflanze (-32 %) (Abb. 4.3.5C). Diese Unterschiede nivellierten sich im späteren Verlauf.
- Die Fruchtbildung war in geprimten Pflanzen verzögert, mit 25 % weniger Früchten in geprimten Pflanzen und 12 % weniger in geprimten und gestressten Pflanzen im Vergleich zur ungeprimten Kontrollgruppe (Abb. 4.3.5D). Diese Verzögerung hielt bis zur 10. Woche nach dem Priming an. Am Ende des Experiments gab es keine Unterschiede im Gesamtertrag oder in der Frischmasse (FM) zwischen den Behandlungen, obwohl einzelne Früchte nach BTH-Behandlung kleiner waren (-4 %).
- Benzothiadiazol (BTH) zeigte in den durchgeführten Experimenten überwiegend negative Auswirkungen auf das Pflanzenwachstum und die Entwicklung. Die mit BTH behandelten Pflanzen wiesen eine geringere Blattanzahl und kleinere Früchte auf, die Pflanzenhöhe und die Wachstumsrate wurden jedoch nicht beeinflusst. Zudem schien BTH keinen signifikanten Beitrag zur Verbesserung der Stressresistenz oder zur Förderung des Wachstums unter Salzstress zu leisten. Angesichts dieser überwiegend nachteiligen Effekte wurde BTH in den weiteren Untersuchungen nicht weiter berücksichtigt.

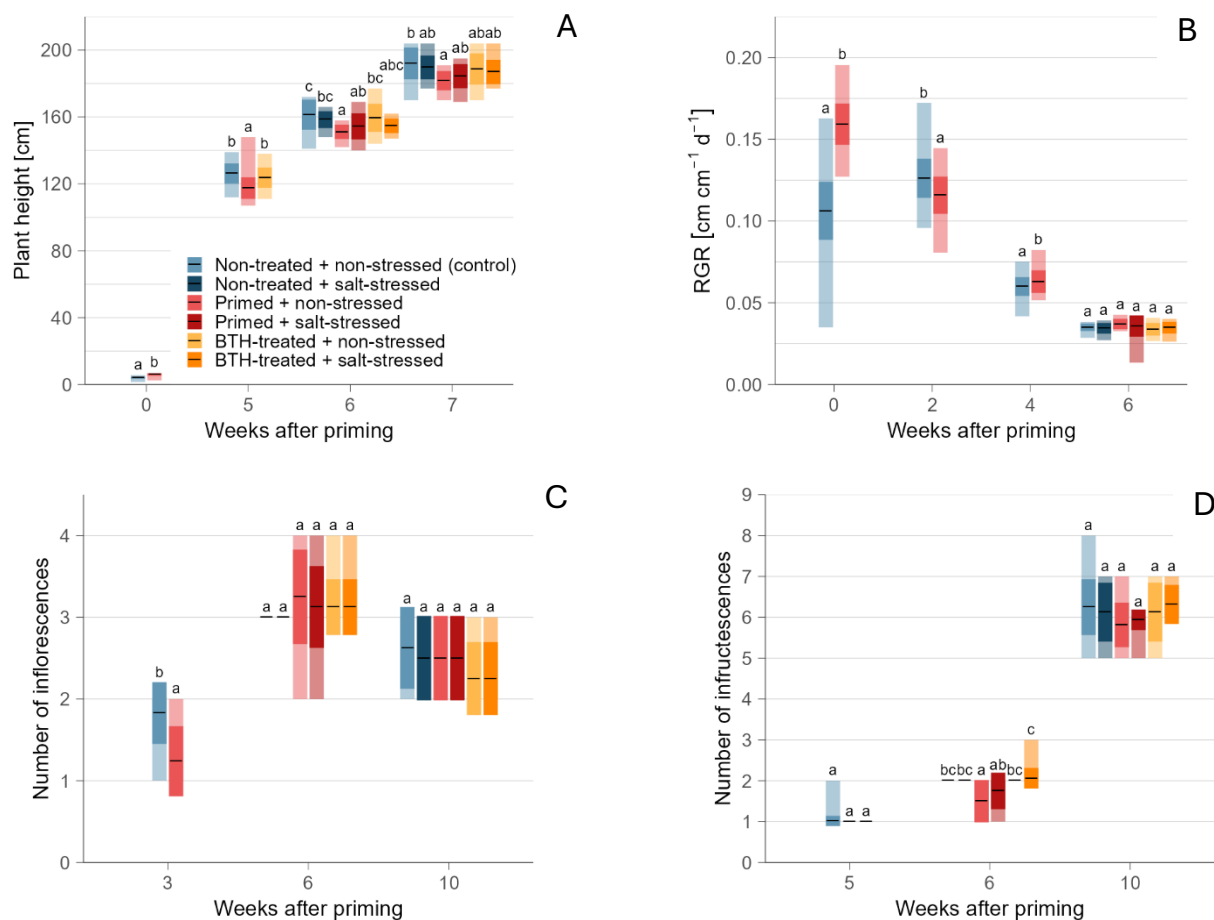


Abb.4.3.5: Wachstumsparameter von Tomatenpflanzen, dargestellt durch den Mittelwert (schwarze horizontale Linie), die Standardabweichung (intensiv gefärbte innere Box) sowie das Maximum und Minimum (hell gefärbte äußere Box), zusammengefasst nach Wochen nach dem Priming und differenziert nach sechs Behandlungen: unbehandelt und nicht salzgestresst (Kontrolle), unbehandelt und salzgestresst, geprimt und nicht salzgestresst, geprimt und salzgestresst, BTH-behandelt und nicht salzgestresst, sowie BTH-behandelt und salzgestresst in Experiment 1. (A) Pflanzenhöhe; (B) relative Wachstumsrate (RGR); (C) Anzahl der Blütenstände; (D) Anzahl der Fruchtstände. Unterschiedliche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen in derselben Woche nach dem Priming (ANOVA und EMMs post hoc; $\alpha = 0,05$). Die ursprüngliche Stichprobengröße nach dem Priming betrug für die Pflanzenhöhe $n = 277$ ($n = 273$ für RGR) bei unbehandelten Pflanzen (Kontrolle) und $n = 139$ ($n = 138$ für RGR) bei geprimten Pflanzen. Bei 2 WAP (Wochen nach dem Priming) reduzierte sich die Stichprobengröße auf $n = 224$ für unbehandelte und $n = 112$ für geprimte Pflanzen; bei 3 und 4 WAP auf $n = 192$ (unbehandelte) bzw. $n = 96$ (geprimte) Pflanzen pro Behandlung. Bei 5 WAP betrug die Stichprobengröße für alle Parameter $n = 64$ Pflanzen pro Behandlung; ab 6 WAP waren es $n = 16$ Pflanzen pro Behandlung. Datenerhebung, -Analyse, und Darstellung: Tobias Körner, Hochschule Geisenheim.

Zur **Untersuchung der Wirksamkeit von Hitze-Priming gegenüber eines ein- sowie zweimalig aufeinanderfolgenden Salzstresses** wurde ein Versuch mit der Tomatensorte „Adeleza“ von Februar bis Juli (20 Wochen) im Gewächshaus in Hinblick auf das spätere Pflanzenwachstum und die Ertragsleistung durchgeführt (Experiment 3). Dazu wurden neben der Erhebung von vegetativen und generativen Messgrößen (Pflanzenhöhe, Anzahl von Blättern/ Wachstumsstadien, Wachstumsraten, Anzahl an Blüten- und Fruchtständen, etc.) sowohl Blattproben von jungen und alten Blättern zu sieben Zeitpunkten über den gesamten Versuchszeitraum zur Evaluierung der Pflanzenabwehr als auch Fruchtproben von frühen (dritter Fruchtstand), mittleren (fünfter Fruchtstand) und späten (siebter Fruchtstand) Tomatentrossen

zur Bestimmung der Fruchtqualität (Zucker und Säure, Ascorbinsäure/ Vitamin C, phenolische Verbindungen, etc.) genommen (Körner et al. 2024a). Es wurden folgende Erkenntnisse gewonnen:

- Hitze-Priming steigerte zeitweise die Pflanzenabwehr (Anreicherung von Phenolen und Flavonoiden in Blättern zum Schutz vor oxidativen Stress) von Tomatenpflanzen im Vergleich zu Kontrollpflanzen (Abb. 4.3.6 A,B) bei nachfolgendem Salzstress. Dies deutet auf eine induzierte Kreuztoleranz durch das Hitze-Priming gegenüber Salinität hin.
- Das Pflanzenwachstum war anfänglich nach den Stressbehandlungen in Wechselwirkung mit dem Hitze-Priming zunächst verzögert, und erholte sich schließlich, so dass gegen Ende des Versuchs keine Unterschiede mehr zwischen den geprimten (Hitze-behandelten) Pflanzen zu erkennen waren.
- Hinsichtlich physiologischer Reaktionen auf Salzstress zeigte sich, dass das Hitze-Priming zu einer anfänglichen Reduktion der stomatären Leitfähigkeit führte, die jedoch später durch den Salzstress überlagert wurde. Dabei wiesen die geprimten Pflanzen keine dauerhaften Veränderungen im Vergleich zu der Kontrollgruppe auf. Die Reaktionsmuster bei der Elektronenübertragungsrate (ETR) waren uneinheitlich, wobei ungeprimte Pflanzen nach dem zweiten Salzstress eine geringere ETR aufwiesen als zweimal Salz-gestresste oder geprimte Pflanzen.
- Die generative Entwicklung (Blüten- und Fruchtbildung) wurde zunächst durch Hitze-Priming und Salzstress verzögert. Die geprimten Pflanzen erholten sich jedoch und wiesen nach 10 Wochen eine höhere Anzahl an Blüten und Früchten auf als die Kontrollpflanzen. Besonders auffällig war, dass die Ertragsminderung zu Beginn der Versuche durch die Verzögerungen in der Blüten- und Fruchtentwicklung im späteren Verlauf der Versuchsperiode ausgeglichen wurde, sodass der Gesamtfruchtertrag der verschiedenen Behandlungen zum Versuchsende vergleichbar war.
- In Bezug auf die Fruchtqualität zeigte sich, dass geprimte und zweimal Salz-gestresste Pflanzen einen erhöhten Gehalt an Carotinoiden (+38% im Vergleich zu ungeprimten Pflanzen) aufwiesen. Dennoch führte das Hitze-Priming und der Salzstress nicht zu einer Akkumulation von phenolischen Verbindungen in den Früchten, sondern vielmehr zu einer Reduktion des Gehalts an Gesamtsäure und -zucker (Glukose und Fruktose) in den Früchten. Besonders hervorzuheben ist der Anstieg des Stärkegehalts in den Früchten geprimter Pflanzen nach dem Salzstress (+54% bei den späten Fruchtreifen). Dies deutet auf eine verzögerte Fruchtreifung im Vergleich zu den Früchten der Kontrollpflanzen hin.

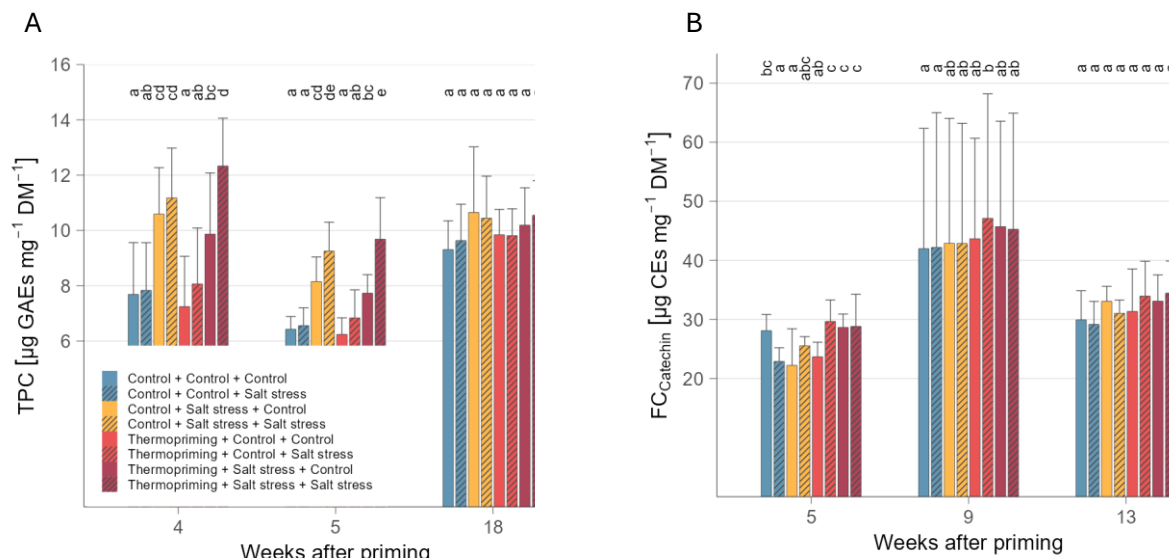


Abbildung 4.3.6: (A) Gesamtphenolgehalt (TPC; ausgedrückt in GAE, Gallussäure-Äquivalente) und (B) Flavonoidgehalt (FC; ausgedrückt in CEs, Catechin-Äquivalente), dargestellt durch Mittelwerte (Säulen) und Standardabweichung (Fehlerbalken), von Tomatenpflanzen für Wochen nach dem Priming in (A) ontologisch älteren und (B) jungen vollentwickelten Blättern, differenziert für die acht Behandlungen. Die unterschiedlichen Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede (ANOVA und EMMs als Post-hoc-Test; $\alpha = 0,05$) zwischen den Gruppen in derselben Woche nach dem Priming. Datenerhebung, -Analyse, und Darstellung: Tobias Körner, Hochschule Geisenheim.

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Anwendung eines Hitze-Primings Tomatenpflanzen durch einen zeitweisen gesteigerten Gehalt von sekundären Blatinhaltsstoffen kurzfristig vor oxidativen Schäden bei Folgestress schützen kann. Obwohl das Hitze-Priming keine vollständige Prävention der durch Salzstress bedingten Wachstumsverzögerungen ermöglichte, verlief die anschließende Spross- und Fruchtentwicklung ähnlich wie bei ungeprimten Pflanzen. Es zeigte sich durch die Priming-Behandlung keine negative Auswirkung auf die finale Ertragsleistung. In Früchten bewirkte das Hitze-Priming erhöhte Gehalt an sekundären Metaboliten wie Carotinoiden, während es gleichzeitig den Gehalt an Zucker und Säuren in den Früchten reduzierte.

Zur Untersuchung der **Wirksamkeit von Salz-Priming gegenüber nachfolgendem abiotischem Stress mittels UV-B-Strahlung, Salinität oder Hitze** während der generativen Entwicklungsphase wurde ein Versuch mit der Tomatensorte „M82“ von Juni bis Oktober 2023 (15 Wochen) im Gewächshaus durchgeführt (siehe Abb.4.3.7A, Experiment 4). Der Folgestress wurde erfolgreich durch den etablierten Gewächshauswagen mit UV-B-Lampen und Dunkelstrahlern appliziert (Abb. 4.3.7 B, C).



Abbildung 4.3.7: Pflanzenbestand von Tomatensorte ‚M82‘ im Gewächshaus (A), Vorderansicht von Gewächshauswagen (B) und weitere Ansicht von Gewächshauswagen im Einsatz (C). Bilder: Tobias Körner, Hochschule Geisenheim.

Es wurden Blattproben genommen und diese auf Primär- und Sekundärmetabolite analysiert, um die Stresstoleranz von geprimten und ungeprimten Pflanzen zu evaluieren. Folgende Erkenntnisse zeigten sich:

- Salz-Priming führte zu einer reduzierten Pflanzenhöhe, reduzierten Chlorophyllgehalt und einer verzögerten Blüten- und Fruchtentwicklung, aber auch zeitweise zu einer Steigerung des Flavonolgehalts in Blättern (siehe Abb. 4.3.8) als Indiz für eine erhöhte Pflanzenabwehr. Der Gesamtertrag und die Anzahl marktfähiger Früchte waren unbeeinflusst.
- Salz-Priming in Wechselwirkung mit Folgestress resultierte allgemein in höheren Wachstumsraten (Pflanzenhöhe) von geprimten Pflanzen gegenüber Kontrollpflanzen (bis zu +27%). Auch hier waren aber keine Effekte auf den gesamten Fruchtertrag und Anzahl an vermarktbarer Früchten erkennbar.
- Salinität als Folgestress (ohne Priming) führte zu einer reduzierten Pflanzenhöhe und einer deutlichen Steigerung des Flavonolgehalts.
- Pflanzen mit Hitze als Folgestress bildeten die geringste Frischmasse aus (–21% zur Kontrolle). Dafür zeigten sie erhöhte Chlorophyllgehalte in Blättern (1 Monat nach der Stressapplikation).
- Ähnlich zu Hitze, induzierte auch UV-B erhöhte Chlorophyllgehalte in den Blättern (1 Monat nach der Stressapplikation).
- Salinität während des vegetativen Wachstums beeinflusste zwar Pflanzenwachstum und -physiologie im Gewächshaus, aber nicht den akkumulierten Fruchtertrag.
- Ausschließlich Salinität hatte einen Einfluss auf den Sekundärmetabolismus (Flavonolanreicherung) und folglich auch auf die Pflanzenabwehr mittels oxidativer Schutzpigmente in den Blättern. Die anderen Stressbedingungen hatten vermutlich keine ausreichende Intensität, um eine vergleichbare physiologische Stressantwort in der Pflanze auszulösen.

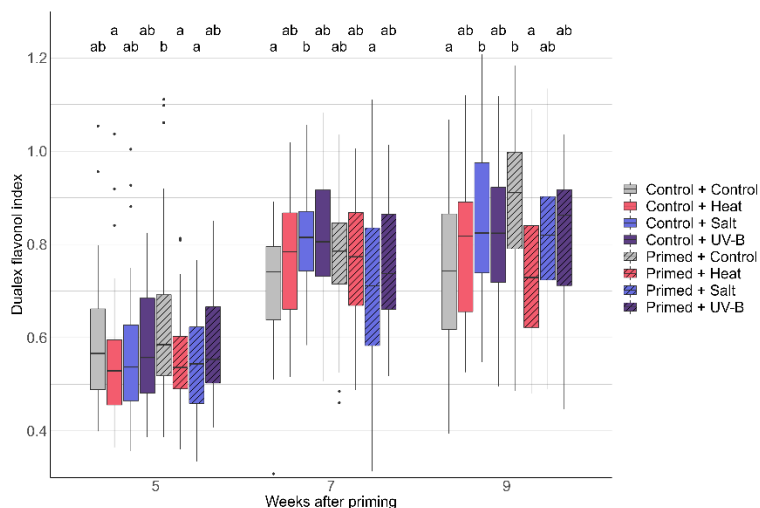


Abbildung 4.3.8: Dualex-Flavonol-Index, dargestellt durch Boxplots, von Tomatenpflanzen Wochen nach dem Priming, differenziert für acht Behandlungen. Unterschiedliche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede (ANOVA & EMMs Post-hoc; $\alpha=0,05$) zwischen den Gruppen in derselben Woche nach dem Priming an. $n = 16$ Pflanzen pro Behandlung. Datenerhebung, -Analyse, und Darstellung: Tobias Körner, Hochschule Geisenheim.

Zusammenfassend zeigte sich, dass Salz-Priming die Resilienz der Sorte ‚M82‘ gegenüber extremen Umweltbedingungen verbessern kann, indem es das Wachstum unter späterem Stress fördert, während der Gesamtertrag nicht beeinträchtigt wird.

Zur **Evaluierung der Wirksamkeit des Hitze-Primings** an ‚Adeleza‘ wurde in Experiment 5 fortführend die schützende Auswirkung des Hitze-Primings bei einem kontinuierlichen Salzstress analysiert, um die physiologischen Reaktionen auf kurzzeitige Stressbedingungen gegenüber langfristigen abzugleichen. Zur Reaktivierung des pflanzlichen Abwehrstatus wurden die Pflanzen 14 Tage nach dem Hitze-Priming mit einer Salzlösung (100 mM NaCl) im BBCH-Stadium 14 behandelt und eine Woche später in Substratdämme unter kontinuierlichem Dauersalzstress ins Gewächshaus gepflanzt.

- Dabei zeigte Hitze-Priming nur geringe Auswirkungen auf den in Fluoreszenzmessungen erfassten Gehalt epidermaler Flavonole (Flav Index) junger sowie ontologisch älterer Blätter im Vergleich zu Blättern der Kontrollpflanzen. Grundsätzlich zeigte unabhängig vom Blattentwicklungsstadium, dass sowohl der Dauerstress, als auch die Kombination von einem vorausgegangenen reaktivierenden Salzstress mit einem Salzdauerstress in höheren Flav-Werten bei älteren und geringere bei jungen Blättern resultierte. Ebenso erhöht waren in alten Blättern die Gehalte an Anthozyanen (Anth-Index) und reduziert in jungen Blättern. Dahingehend wiesen Blätter unter Dauersalzstress geringere Chlorophyllgehalte (Chl-Index) auf als die Blätter der Pflanzen ohne kontinuierlichen Salzstress.
- In Bezug auf die Fruchtentwicklung zeigte sich, dass kontinuierlicher Salzstress das Wachstum der Pflanzen reduzierte und den Fruchtertrag minderte, ohne jedoch eine signifikante Wechselwirkung mit dem Hitze-Priming zu haben. Hitze geprimte Pflanzen erzielten eine höhere Fruchtqualität, was sich in einem höheren Brix-Wert der Früchte zeigte. Auch die Gesamtsäure war in den Früchten geprimter Pflanzen unter Salinität höher, was eine verbesserte Fruchtqualität unter Stressbedingungen indiziert. Allerdings führte Hitze-Priming ebenso zu einem höheren Anteil an Früchten mit Blütenendfäule.

Es konnte festgestellt werden, dass Hitze-Priming keine physiologisch mildernden Effekte unter anhaltendem Salzstress bewirkt.

Unter Berücksichtigung der **praxisrelevanten Bedeutung von Sorten mit Resistenzen gegenüber dem agronomisch relevanten Jordanvirus wurde ein Anbauversuch** mit weiteren Tomatensorten durchgeführt. In diesem wurde die Effektivität des Hitze-Primings bei den gegen den Jordanvirus resistenten Sorten ‚Saint Anna F1‘, ‚Bronski F1‘, ‚Dunk F1‘ und ‚Goudski F1‘ im Vergleich zur Standardsorte ‚Adeleza F1‘ unter anschließendem, zweimaligem Salzstress evaluiert, um die Ertragsleistung unter diesen abiotischen Stressbedingungen zu vergleichen (Experiment 7, (Körner et al. 2025)).

Dabei zeigte die Hitze-Priming-Behandlung einen signifikanten Einfluss auf das Wachstum sowie den Gehalt an sekundären Pflanzenstoffen, insbesondere Carotinoiden, Phenolen und Flavonoiden, in den Blättern der getesteten Tomatensorten. Der Gehalte oxidativ wirksamer Carotinoide als Schutzmechanismus war in den Blättern der Sorten ‚Bronski F1‘ und ‚Goudski F1‘ vergleichsweise zu den anderen Sorten am höchsten (Abb. 4.3.9). Hinsichtlich der Gesamtbiomasse wiesen ‚Adeleza F1‘ und ‚Bronski F1‘ unter Hitze-Priming und anschließendem Stress eine tolerante Reaktion auf, da ihr Wachstum dem der Kontrollpflanzen entsprach.

Die Sorten lassen sich in ihrer Reaktion auf das Priming sowie dem Salz-Folgestress wie folgt beschreiben:

- ‚Adeleza F1‘ zeigte eine dynamische Reaktion mit anfänglicher Höhenzunahme nach Hitze-Priming, die unter Salzstress zurückging. Geprimte Pflanzen entwickelten unter Salzstress mehr Blätter, was auf eine verbesserte Stresstoleranz hinweist. Der Chlorophyll-Index stieg nach Priming und blieb hoch, während Carotinoide und sekundäre Metabolite unterschiedlich reagierten.
- ‚Bronski F1‘ zeigte die höchste Toleranz und war priming-responsiv. Wachstum und Blühbeginn wurden kaum beeinflusst, während Salzstress die Biomasseverteilung veränderte. Der Chlorophyll- und Anthocyan-Index blieb stabil, während Carotinoide und phenolische Verbindungen nur in Blättern angereichert wurden die ausschließlich eine Priming-Behandlung erhielten. Bei anschließendem Folgestress wurde keine Anreicherung festgestellt.
- ‚Saint Anna F1‘ zeigte nach Hitze-Priming eine Höhenreduktion, die unter Salzstress verstärkt wurde, aber mit höheren Wachstumsraten bei geprimten Pflanzen. Der Chlorophyll-Index blieb nach Stress erhöht, während Carotinoide, Flavonoide und Anthocyane in geprimten Pflanzen erhöht waren und bei Folgestress abnahmen.
- ‚Goudski F1‘ wuchs nach Priming höher, jedoch wurde die Höhe unter Salzstress reduziert. Die Wachstumsrate blieb unter Stressbedingungen stabil. Der Blühbeginn verzögerte sich nach Salzstress. Carotinoide und Anthocyane waren nach Priming unabhängig vom Salzstress erhöht, während Flavonole altersabhängig beeinflusst wurden.
- ‚Dunk F1‘ zeigte zunächst ein Höhenwachstum nach Priming, das sich unter Stress reduzierte. Das Priming verzögerte die Entwicklung, aber geprimte Pflanzen blühten früher. Frisch- und Trockenmasse wurden nur durch die Kombination von Priming und Stress reduziert. Der Gehalt von Chlorophyll, Anthocyanen und Carotinoiden sank unter Salzstress. Erhöhte Gehalte dieser Blattinhaltsstoffe wurden ausschließlich durch die Primingbehandlung (ohne Folgestress) erfasst.

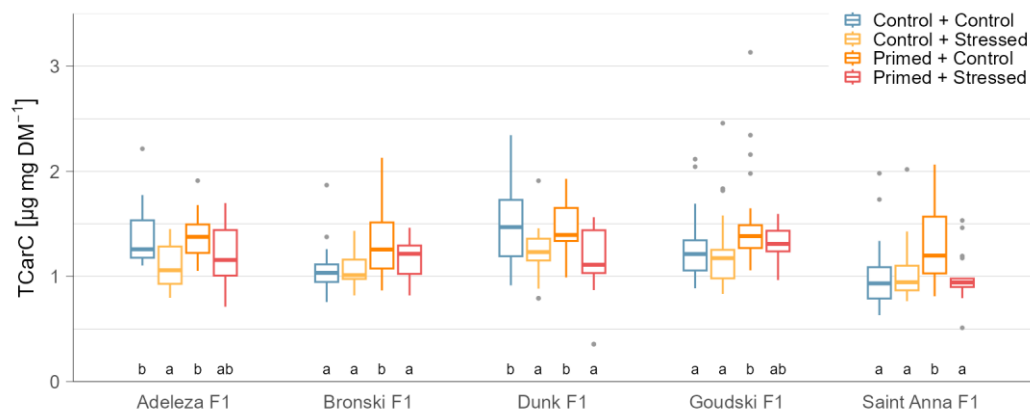


Abbildung 4.3.9: Boxplots des Gesamtcarotinoidgehalts (TCarC) 28 Tage nach dem Priming (DAP) für die vier Behandlungsgruppen: ungeprimt und ungestresst (Kontrolle), ungeprimt und salzgestresst, geprimt und ungestresst sowie geprimt und salzgestresst in Experiment 7. Der Carotinoidgehalt wird auf Trockenmassebasis (DM) angegeben. Signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen innerhalb einer Sorte sind durch unterschiedliche Buchstaben gekennzeichnet. Dabei repräsentiert der Buchstabe „a“ die Gruppe(n) mit den niedrigsten Werten (ANOVA mit EMMs-Post-hoc-Test, $\alpha = 0,05$). Die Stichprobengröße pro Behandlungsgruppe beträgt $n = 26-30$. Datenerhebung, -Analyse, und Darstellung: Tobias Körner, Hochschule Geisenheim.

Insgesamt zeigte sich somit die Sorten ‚Saint Anna F1‘ und insbesondere ‚Bronski F1‘ als im Vergleich zu den anderen Sorten als tolerant während des Salz-Folgestresses sowie Priming-responsiv und könnten daher für den zukünftigen Produktionsanbau unter abiotischem Stressbedingungen sowie dem potenziellen Jordan-Infektionsdruck als vielversprechend angesehen werden.

Um das Hitze-Priming zu validieren wurden zudem weitere **Nebenexperimente an Jungpflanzen** durchgeführt. Dabei wurden in zwei Sätzen (Nebenexperiment „N“ 1-2) die Auswirkungen eines wiederkehrenden Hitzestresses in Klimaschränken (Topfkultur) bei einem vorausgegangenen Hitze-Priming an Tomatenjungpflanzen der Sorte ‚Adeleza‘ untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass Hitze-Priming bei N1 bei nachfolgendem Hitzestress zu erhöhten Blattgehalten sowohl bei den Flavonoiden, selektiv für Catechin und Quercetin, als auch bei den Anthocyanen führte. Einfach gestresste, lediglich geprimte Pflanzen wiesen niedrigere Werte auf als doppelt Hitze gestresste. Der Aufbau dieser Schutzpigmente ging mit einer reduzierten finalen Biomasse, Wuchshöhe und Blattfläche einher. Tendenziell höhere Chlorophyllgehalte (Chlorophyll a und b) der Blätter geprimter und ggf. erneute Hitze gestressten Pflanzen deuten darauf hin, dass hier eine Aufkonzentration durch geringeres Wachstum vorlag. Diese negativen Wachstumseffekte konnten bei N2 ebenfalls nachgewiesen werden, wobei sich gesteigerte Blattgehalte an Chlorophyll, Flavonoiden und Anthocyanen nur tendenziell widerspiegeln.

Zur Validierung bisheriger Erkenntnisse wurde ein **Demonstrationsversuch am Versuchszentrum Gartenbau der Landwirtschaftskammer NRW** mit der Tomatensorte var. ‚Adeleza F1‘ durchgeführt, um den Einfluss von Salz- und Hitze-Priming auf den Frucht- und Biomassertrag unter Praxisbedingungen bei nachfolgendem Salz- bzw. Hitzestress zu analysieren.

Dafür wurden Jungpflanzen, entsprechend der Versuchserfahrung an der Hochschule Geisenheim (G) durch Hitze-Priming und am Forschungszentrum Jülich (J) durch Salz-Priming, vorbehandelt. Die Pflanzen wurden im Dezember 2023 zum Versuchszentrum Straelen transportiert, zwischenkultiviert und im Januar in Steinwollmatten transferiert. Mit der Ernte des ersten Fruchtstandes wurde durch eine angepasste Temperaturregelung Hitzestress in der 16. Kalenderwoche appliziert sowie durch Zugabe von einer Kochsalz-Lösung ein EC von 20 mS cm^{-2} in den Steinwollmatten erzielt. Über eine Versuchsdauer bis zur 31. Kalenderwoche wurde das Pflanzenwachstum und der Fruchtertrag erfasst sowie an ausgewählten Tagen Blattmessungen durchgeführt und Fruchtproben genommen (Abb.4.3.10).



Abbildung 4.3.10: Pflanzenbestand von Tomatensorte ‚Adeleza‘ im Gewächshaus der Landwirtschaftskammer NRW Versuchszentrum Gartenbau Straelen. Bild: Sanghyo Moon, Universität Bonn.

Es zeigte sich, dass ausschließlich langanhaltender Salzstress als Folgestress das Pflanzenwachstum reduzierte und in Folge ebenso die reproduktive Entwicklung die Anzahl an Blütenständen (Abb. 4.3.11) sowie Blütenstandslänge und -durchmesser verringerte. Der marktfähige Fruchtertrag wurde durch die Priming-Behandlungen bis zur finalen Ernte nicht signifikant beeinflusst (Abb. 4.3.12), wobei es durch Hitze- und insbesondere Salz-Folgestress zu einer signifikanten Abnahme kam.

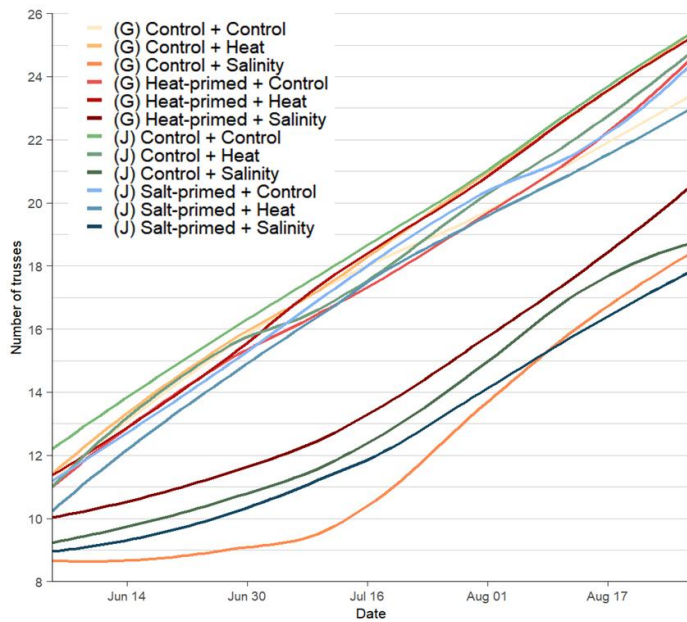


Abb.4.3.11: Anzahl der Blütenstände der Hitze und Salz geprimten Pflanzen bei nachfolgendem Salz- bzw. Hitzestress im Demonstrationsversuch an der LWK NRW in Straelen. Nach dem Priming im Dezember 2023 wurde mit Ernte des ersten Fruchtstandes am 13.05.2024 der nachfolgend Hitze- bzw. Salzstress appliziert. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen. Die Stichprobengröße pro Behandlungsgruppe beträgt $n = 5$ (ANOVA mit EMMs-Post-hoc-Test, $\alpha = 0,05$). Datenerhebung, -Analyse, und Darstellung: Tobias Körner, Hochschule Geisenheim.

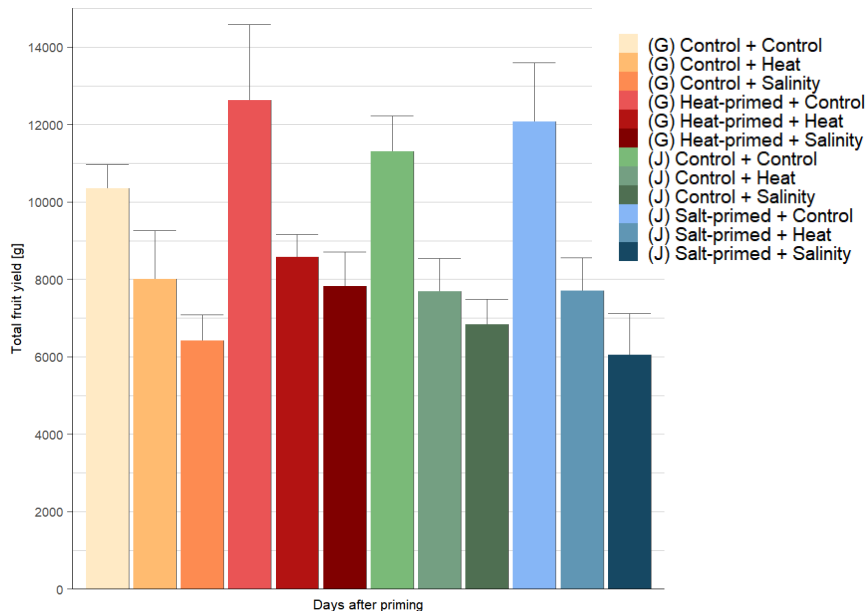


Abb.4.3.12: Kumulierter Gesamtfruchtertrag Hitze und Salz geprimten Pflanzen bei nachfolgendem Salz- bzw. Hitzestress im Demonstrationsversuch an der LWK NRW in Straelen. Nach dem Priming im Dezember 2023 wurde mit Ernte des ersten Fruchtstandes am 13.05.2024 der nachfolgend Hitze- bzw. Salzstress appliziert. (G) Pflanzen aus Geisenheim, (J) Pflanzen aus Jülich. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen. Die Stichprobengröße pro Behandlungsgruppe beträgt $n = 5$ (ANOVA mit EMMs-Post-hoc-Test, $\alpha = 0,05$). Datenerhebung, -Analyse, und Darstellung: Tobias Körner, Hochschule Geisenheim.

Eine stagnierende Fruchtbildung wurde insbesondere bei den Hitze-geprimten Pflanzen zu Beginn des Salzstresses erfasst (Abb. 4.3.12). Der Zuckergehalt der Früchte (Brix) blieb durch Priming und nachfolgenden Hitzestress unbeeinflusst, während Salzstress zu einem Anstieg des Zuckergehalts führte, mit einem vorübergehenden Spitzenwert bei Salzgeprimten Pflanzen, die längerem Salzstress ausgesetzt waren (Abb. 4.3.13). Die Priming-Behandlungen hatten keinen Einfluss auf die Fruchthaltsstoffe, weder als alleinige Vorbehandlung noch in Wechselwirkung mit den Folgestressen.

Blattmessungen der photosynthetischen Elektronentransportrate zeigten über alle Behandlungen hinweg unveränderte Werte, was darauf hinweist, dass zum Zeitpunkt der Messungen die Stressbedingungen die photosynthetische Effizienz nicht beeinflussten. In den Blättern wurden sowohl im Gesamtchlorophyllgehalt als auch bei sekundären Blattinhaltsstoffen, wie Phenolen und Flavonoiden, keine signifikanten Unterschiede festgestellt. Dahingegen zeigten Chlorophyllfluoreszenzmessungen an intakten Blättern tendenziell reduzierte epidermale Chlorophyllgehalte bei Hitzestress und vorübergehend erhöhte Chlorophyll bei Salzstress (Abb. 4.3.14). Mit Abgleich der Blattinhaltsstoffanalysen ist dies vermutlich auf die technische Abhängigkeit des Messgerätes von Blattdicke und Messbereich zurückzuführen: Hitze gestresste Blätter waren sehr wahrscheinlich morphologisch dünner und Salz gestresste Blätter aufgrund des Zellvolumenverlustes zusammengezogen, so dass es bei letzterem zu einer Aufkonzentration der Blattpigmente im Messbereich kam.

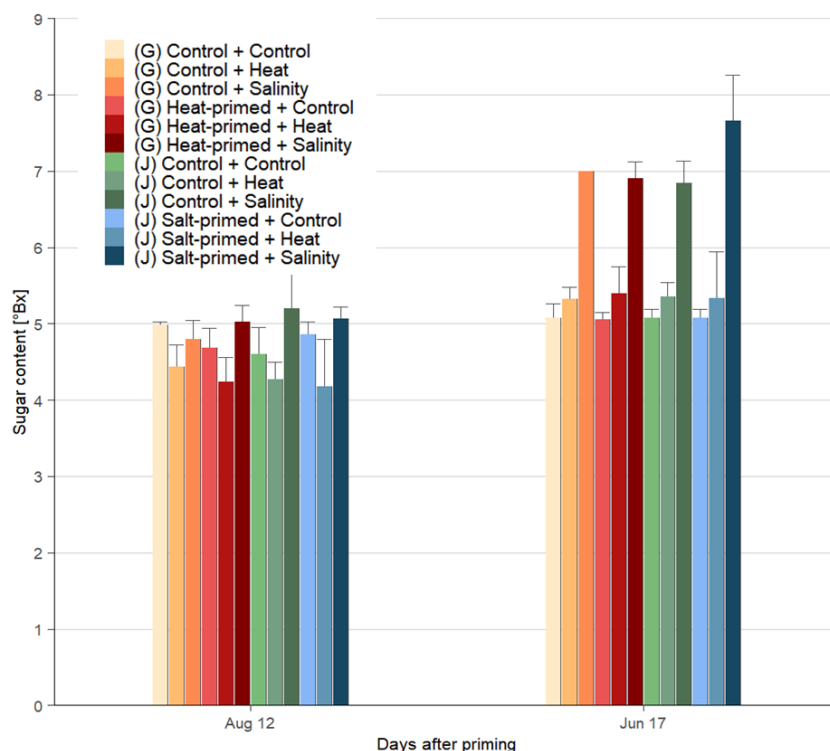


Abb.4.3.13: Analyse des Zuckergehaltes (Brix) der Früchte Hitze und Salz geprimten Pflanzen bei nachfolgendem Salz- bzw. Hitzestress im Demonstrationsversuch an der LWK NRW in Straelen. Nach dem Priming im Dezember 2023 wurde mit Ernte des ersten Fruchtstandes am 13.05.2024 der nachfolgend Hitze- bzw. Salzstress appliziert. (G) Pflanzen aus Geisenheim, (J) Pflanzen aus Jülich. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen. Die Stichprobengröße pro Behandlungsgruppe beträgt $n = 5$ (ANOVA mit EMMs-Post-hoc-Test, $\alpha = 0,05$). Datenerhebung, -Analyse, und Darstellung: Tobias Körner, Hochschule Geisenheim.

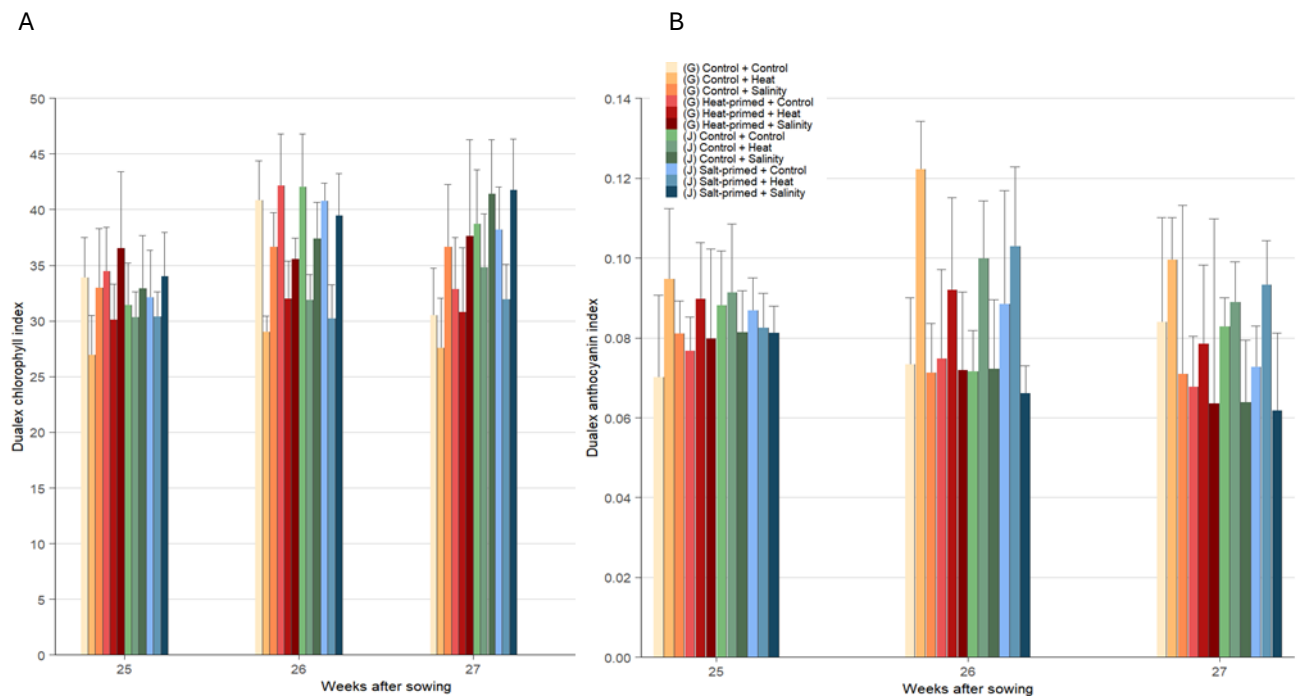


Abb. 4.3.14: Spektrale Bestimmung des Chlorophyllgehaltes (Chl Index, A) und des Anthozyangehaltes (Anth Index, B) der Blätter Hitze und Salz geprimten Pflanzen bei nachfolgendem Salz- bzw. Hitzestress im Demonstrationsversuch an der LWK NRW in Straelen. Nach dem Priming im Dezember 2023 wurde mit Ernte des ersten Fruchtstandes am 13.05.2024 der nachfolgend Hitze- bzw. Salzstress appliziert. (G) Pflanzen aus Geisenheim, (J) Pflanzen aus Jülich. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen. Die Stichprobengröße pro Behandlungsgruppe beträgt $n = 5$ (ANOVA mit EMMs-Post-hoc-Test, $\alpha = 0,05$). Datenerhebung, -Analyse, und Darstellung: Tobias Körner, Hochschule Geisenheim

Zusammenfassend konnten durch die beiden Primingmethoden keine förderlichen Auswirkungen bei nachfolgenden Stressbedingungen erfasst werden, allerdings auch keine nachteiligen Effekte auf die Tomatenproduktion. Es wird vermutet, dass das Zeitfenster zwischen initialem Priming-Vorbehandlung und dem eigentlichen Folgestress so lang war, dass die Pflanzen den Status erhöhter Abwehrstoffe wieder einem üblichen Level angepasst hatten. Zusätzliche Stressanwendung zwischen Priming und Folgestress als eine Art Reaktivierung des Abwehrstatus könnte in zukünftigen Versuchen getestet werden.

4.4. Ergebnisse zu Arbeitspaket 3: Priming und Priming-Effekte während der Fruchtproduktion (Universität Bonn, 2819NA115)

Konzeptionelles Modell

Das endgültige ökonomische Modell der Tomatenproduktion pro Quadratmeter (Abbildung 4.4.1) veranschaulicht die Auswirkungen von Stress-Priming auf die wirtschaftlichen Ergebnisse. Das Modell zeigt, wie Produktionskosten und Stressprävention die Gesamtkosten, den Gesamterlös und letztlich den NPV beeinflussen. Grüne Pfeile zeigen positive Effekte, rote Pfeile negative Effekte, wobei geschätzte und berechnete Variablen getrennt gekennzeichnet sind.

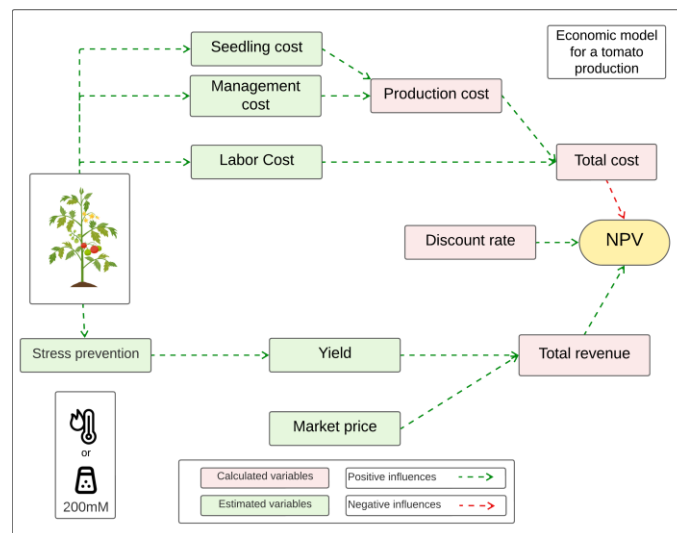


Abbildung 4.4.1: Konzeptionelles Modell der Tomatenproduktion mit Priming mit Fokus auf der Wirtschaftlichkeit.

Abbildung 4.4.2 zeigt das erwartete Umweltmodell für die Einbeziehung von Priming in die Tomatenproduktion und die Produktion von Tomatensämlingen. In Deutschland beträgt der durchschnittliche CO₂-Fußabdruck von frischen Tomaten etwa 0,8 kg CO₂-eq pro kg Tomaten für die konventionelle Produktion und 1,1 kg CO₂-eq für den ökologischen Anbau (Reinhardt et al. 2020). Laut Literatur und Experteninterviews wird erwartet, dass das Priming den ökologischen Fußabdruck der Jungpflanzenproduktion vergrößert. Insbesondere kann das Salz-Priming zu einer Wasserverschmutzung durch die Entsorgung von Salzlösungen führen.

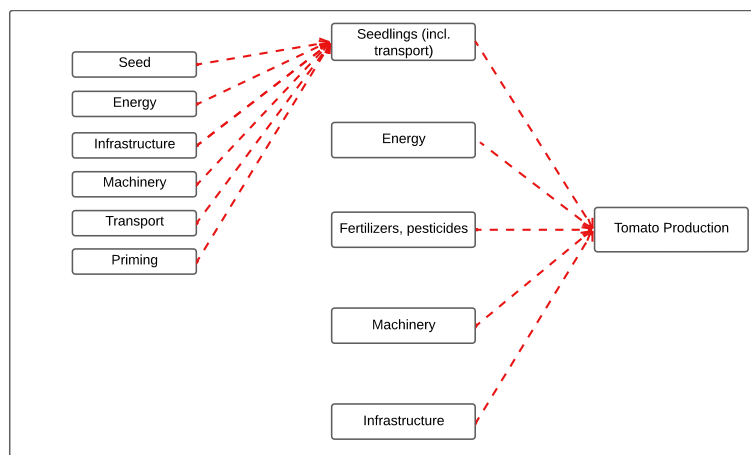


Abbildung 4.4.2: Konzeptionelles Modell der Tomatenjungpflanzen- und Tomatenproduktion mit Priming mit Fokus auf die Umweltaspekte.

Probabilistisches Modell

Abbildung 4.4.3 präsentiert drei analytische Dimensionen – Net Present Value (NPV), Variable Importance in Projection (VIP) Scores (Variable Importance in Projection) und Expected Value of Perfect Information (EVPI) – für die Tomatenproduktion unter verschiedenen Priming-Behandlungen, kategorisiert nach Stressbedingungen (z. B. kein Stress, Hitzestress und Salzstress).

Die linken Felder veranschaulichen die Wahrscheinlichkeitsverteilung der Kapitalwertdifferenz (NPV) in €/m² zwischen der Produktion von geprimten und ungeprimten Tomaten unter drei Umweltbedingungen: Kein Stress, Hitze- und Salzstress. Die orangefarbige Kurve und der entsprechende Boxplot stellen die NPV-Differenz für hitzegeprimte Pflanzen im Vergleich zu ungeprimten Pflanzen dar, während die hellblaue Kurve und der Boxplot den gleichen Vergleich für salzgeprimte Pflanzen darstellen. Unter keinen Stressbedingungen (a) sind beide Primingeffekte mit einem geringen wirtschaftlichen Verlust verbunden, was sich daran zeigt, dass sich die Verteilung der NPV-Differenzen überwiegend unter null befindet. Unter Hitzestressbedingungen (b) verschieben sich die Verteilungen nach rechts, insbesondere bei Hitze-Priming, was auf eine höhere Wahrscheinlichkeit eines wirtschaftlichen Nutzens hinweist. Unter Salzstressbedingungen (c) bleibt die NPV-Verteilung für hitzegeprimte Pflanzen positiv verzerrt, was auf einen potenziellen wirtschaftlichen Nutzen hinweist. Im Gegensatz dazu verschiebt sich die Verteilung für salzgeprimte Pflanzen negativer, was darauf hindeutet, dass ein Hitze-Priming unter diesen Bedingungen wirtschaftlicher sein kann als ein Salz-Priming.

Das Ergebnis der VIP-Scores (die mittleren Felder) zeigt, dass alle Ertragskomponenten – sowohl von vorbereiteten als auch von ungeprimten Tomatenpflanzen – diesen Schwellenwert überschreiten, was ihren starken Einfluss auf die wirtschaftlichen Ergebnisse unterstreicht. Die Erträge von nicht geprimten Pflanzen sind negativ mit der NPV-Differenz korreliert (rote Balken), während die Erträge von geprimten Pflanzen positiv mit der NPV-Differenz korreliert sind (blaue Balken).

In den rechten Feldern wird der Erwartungswert perfekter Informationen (EVPI) für jede Eingabevariable angezeigt. Über alle Behandlungen hinweg weisen die meisten Variablen EVPI-Werte nahe Null auf, was auf einen minimalen wirtschaftlichen Nutzen durch die Verringerung der Unsicherheit in diesen Eingaben hindeutet. Im Gegensatz dazu weisen die Ertragsvariablen durchweg hohe EVPI-Werte (ausgedrückt in €/m²) auf, was ihren erheblichen Einfluss auf das wirtschaftliche Ergebnis unterstreicht.

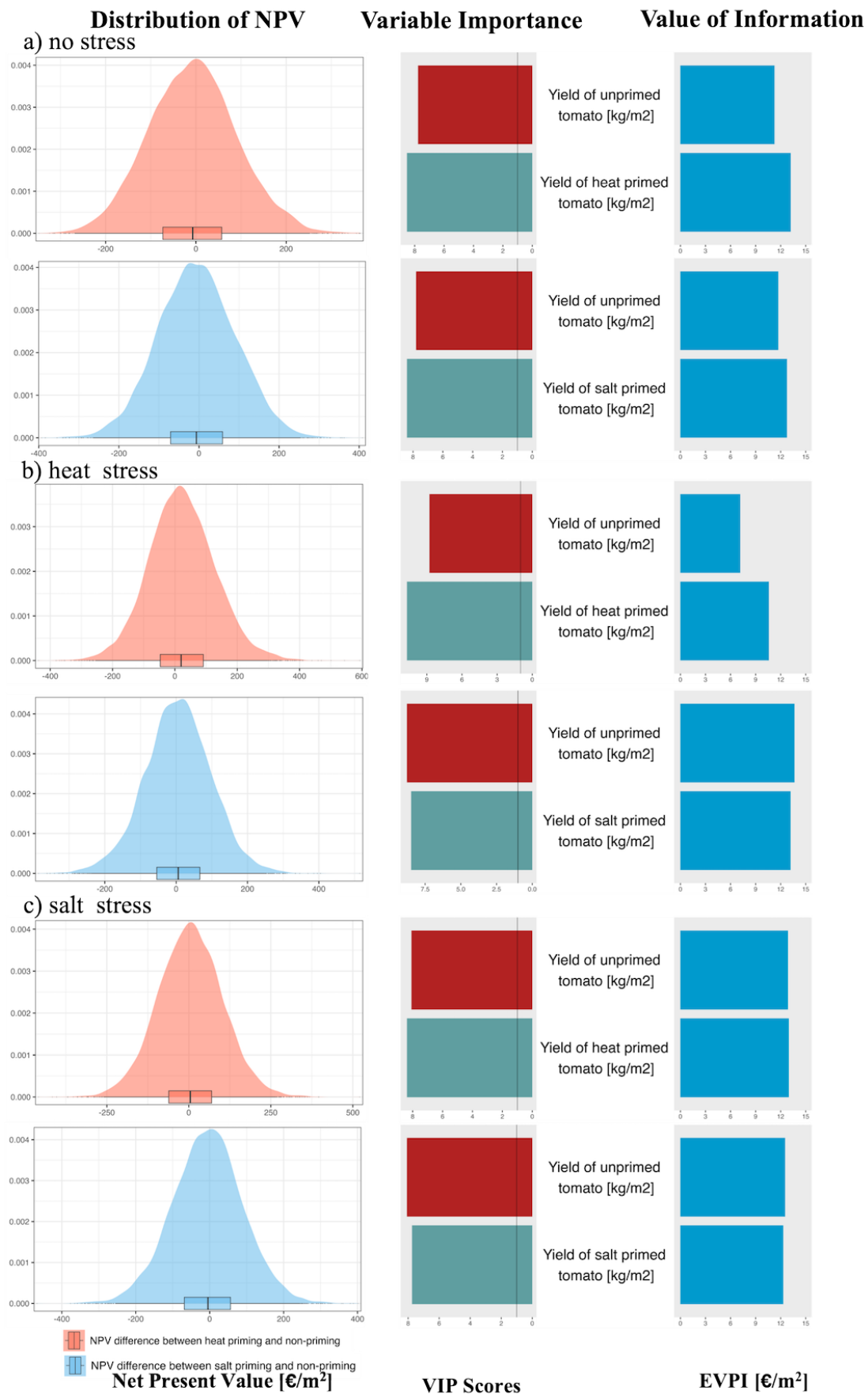


Abbildung 4.4.3: Probabilistische Analyse verschiedener Priming-Entscheidungen unter verschiedenen Bedingungen: a) kein Stress, b) Hitzestress und c) Salzstress.

Optimal Priming, eine interaktive Applikation

Die Anwendung " **Optimal Priming** " (Abbildung 4.4.4) unterstützt die Entscheidungsfindung, indem sie es ermöglicht, die Erfahrungen der Tomatenbauern in Bezug auf jährlich wechselnde Schädlinge, Krankheiten und finanzielle Überlegungen einzubeziehen. Nutzer können eigene Daten für zwei verschiedene Sorten (a) und ihre praktischen Kostendaten für die Tomatenproduktion (b) eingeben. Die Applikation generiert dann einen Kapitalwertvergleich (NPV) zwischen den beiden Sorten sowie Cashflow-Prognosen über einen benutzerdefinierten Zeithorizont, die aus Monte-Carlo-Simulationen abgeleitet wurden. Dieses Tool sammelt die gelebten Erfahrungen von Tomatenbauern, die sich an jährlich wechselnde Schädlinge, Krankheiten und finanzielle Überlegungen anpassen. Es wird erwartet, dass die gewonnenen praktischen Daten von erheblichem Wert für die Weiterentwicklung der probabilistischen Modellierungsforschung in landwirtschaftlichen Kontexten sein werden. Die Applikation wird auf einem von der Universität Bonn gehosteten Server bereitgestellt, der eine von der Posit Community bereitgestellte gespendete Domain verwendet, und ist für Landwirte und Interessengruppen über einen Webbrowser zugänglich [<https://agtools.app/tomaten/>]

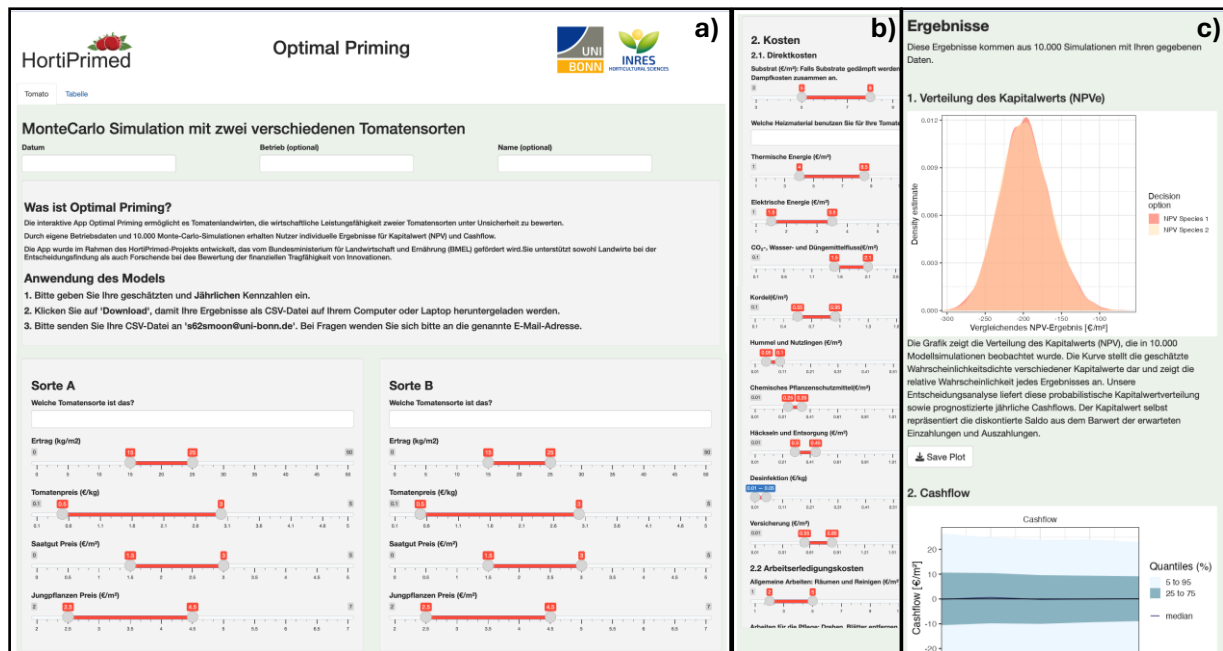


Abbildung 4.4.4: Optimal Priming, eine interaktive Applikation

4.5. Ergebnisse zu Arbeitspaket 4: Molekulare Bestimmung des Primings (Helmholtz Zentrum München, IFE, 2819NA116)

Im Mittelpunkt von AP4 standen umfangreiche epigenomische Analysen, insbesondere Chromatin-Immunpräzipitation gefolgt von Hochdurchsatz-Sequenzierung (ChIP-Seq) und genomweite Bisulfit-Sequenzierung (BS-Seq), um Histonmodifikations- und DNA-Methylierungsmuster im Zusammenhang mit dem Salz-Priming zu untersuchen. Diese Verfahren wurden im Rahmen des Projekts speziell für Tomatenpflanzen etabliert und optimiert. So konnte gezeigt werden, dass mit dem Ausgangsmaterial (Blattgewebe von jungen Tomatenpflanzen) optimale Chromatinfragmentierung für ChIP-Experimente bei etwa 36 Sonikationszyklen erreicht wurde (Abb. 4.5.1). Für die BS-Seq konnten ausreichend hochmolekulare DNA aus lediglich 100 µg Blattmaterial isoliert werden. Die erfolgreiche Optimierung der Methoden ermöglichte qualitativ hochwertige Sequenzierungen und führte zu robusten Alignment-Raten (über 95% bei ChIP-seq und ca. 76% bei BS-seq), die mit etablierten Standards vergleichbar sind.

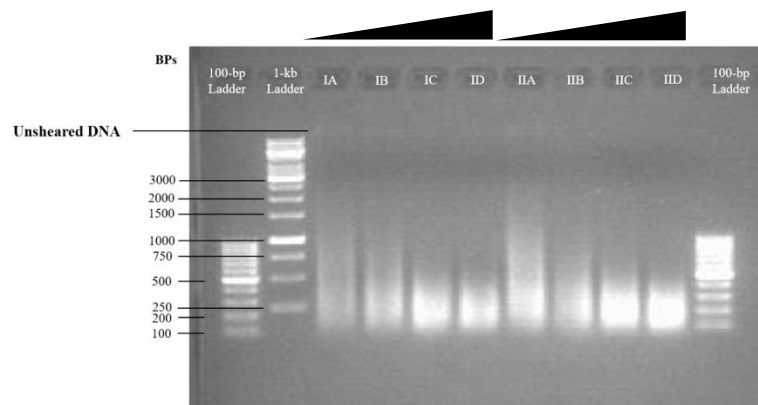


Abbildung 4.5.1: Agarose-Gelelektrophorese von DNA-Proben nach steigender Scherungsdauer. 2 Proben (I und II) wurden für je 12 (A), 24 (B), 36 (C), und 48 (D) Zyklen akustisch gesichert. 1 Zyklus = 20 sec Ultraschall, 40 sec Pause. Die optimale Fragmentgröße liegt bei 500 – 300 bp. Größenstandards sind links gezeigt.

Die bioinformatische Auswertung der ChIP-seq-Daten zeigte insbesondere bei der Histonmodifikation H3K27me3 signifikante und langfristige Veränderungen in den Salz-geprimten Pflanzen, die sich 10 Tage nach dem Priming-Stress von den Kontroll-Pflanzen unterschieden. Während nur wenige Veränderungen in H3K4me3 beobachtet wurden, deuteten zahlreiche neu identifizierte Peaks in den H3K27me3-Proben darauf hin, dass diese spezifische Histonmarkierung eine zentrale Rolle in der langfristigen epigenetischen Stabilisierung des Stressgedächtnisses spielt (Abb. 4.5.2A). Die Annotation dieser differentiellen Regionen offenbarte eine starke Anreicherung in regulatorischen Genen, insbesondere solchen mit Funktionen im Bereich der Nukleinsäurebindung und Endonuklease-Aktivität (Abb. 4.5.2B). Diese Ergebnisse legen nahe, dass durch Salz-Priming induzierte epigenetische Veränderungen eine tiefgreifende regulatorische Funktion im Genom ausüben, die zu erhöhter Stressresistenz beiträgt. Auch die genomweite DNA-Methylierung zeigte deutliche Veränderungen durch das Salz-Priming, insbesondere im CHH-Kontext, einem für Pflanzen charakteristischen Methylierungsmuster (Abb. 4.5.2C). Annotationen der differentiell methylierten Regionen (DMRs) offenbarten hierbei signifikante Anreicherungen für Gene, die in Transportprozessen, insbesondere bei Kationen-Transportern, sowie bei regulatorischen Transkriptionsfaktoren eine Rolle spielen (Abb. 4.5.2D). Da DNA-Methylierung Einfluss auf die Zugänglichkeit und

transkriptionelle Aktivität der betroffenen Regionen hat, könnten diese Veränderungen funktionell mit der erhöhten Fähigkeit zur Stressbewältigung in Verbindung stehen.

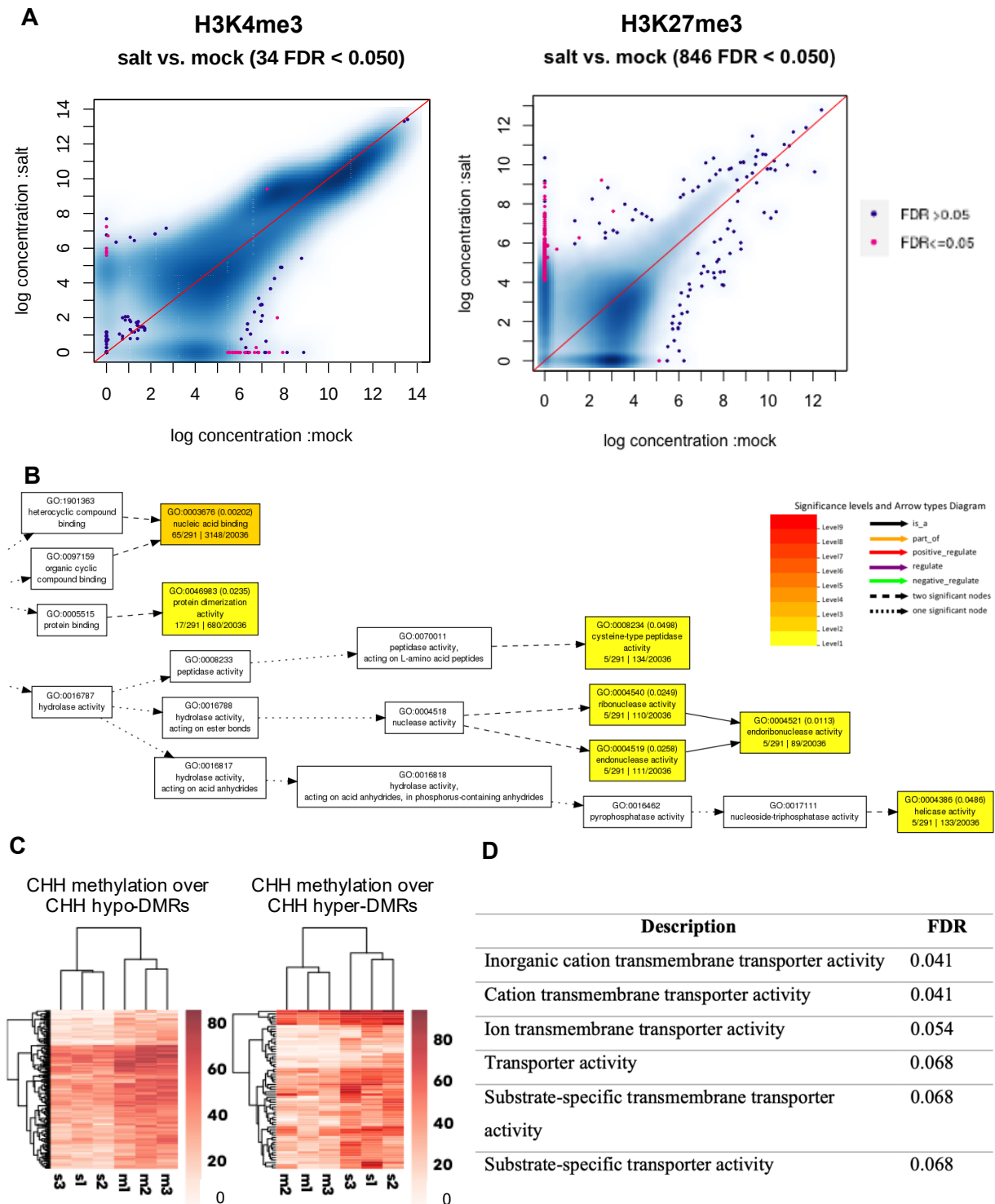


Abbildung 4.5.2: Salz-Priming führt zu anhaltenden Veränderungen der DNA- und Histonmethylierung.

(A) Streudiagramme der normalisierten ChIP-seq-Signaldichten (log-Konzentration) an Konsensus-Peaks für H3K4me3 (links) und H3K27me3 (rechts). Differentiell angereicherte Peaks sind in Pink hervorgehoben.

(B) Graphische Darstellung der signifikant angehäuften funktionellen Annotationen (GO-Kategorien „Molekulare Funktion“) von Genen, die mit H3K27me3 Salz-Priming-spezifischen Peaks assoziiert sind. (C) Heatmap der CHH-Methylierungsniveaus an differentiell methylierten Regionen (DMRs). (D) GO-Term-Anreicherung von Genen, die mit CHH DMRs assoziiert sind.

Daher wurden parallel zu den epigenetischen Analysen umfangreiche RNA-seq-Experimente in Zusammenarbeit mit den Partnern 1 und 5 durchgeführt, um die Auswirkungen des Salz-Primings auf die Genexpression bei erneutem Salzstress zu erforschen. Diese Analysen ergaben, dass Salz-geprimte Pflanzen hunderte Gene sowohl transient als auch langfristig veränderten (Abb. 4.1.7, 4.1.8., Tabelle 4.1.2 und Abb. 4.2.6). Die bioinformatische Auswertung zeigte eine signifikante Überrepräsentation von Genen, die an Abwehrmechanismen und Zellwandbiogenese beteiligt sind. Insbesondere die erhöhte Expression von Genen der Zellwandbildung deutet darauf hin, dass primäre strukturelle Anpassungen zur verbesserten Stressbewältigung beitragen könnten (Abb. 4.5.3). So ergaben sich deutliche phänotypische Unterschiede in Wachstumsraten und phenolischem Gehalt: Salz-geprimte Pflanzen wiesen während eines sekundären Salzstresses deutlich erhöhte Wachstumsraten auf und produzierten größere Mengen phenolischer Verbindungen, die bekanntermaßen Schutzfunktionen gegen biotischen und abiotischen Stress besitzen (siehe Ergebnisse von AP1).

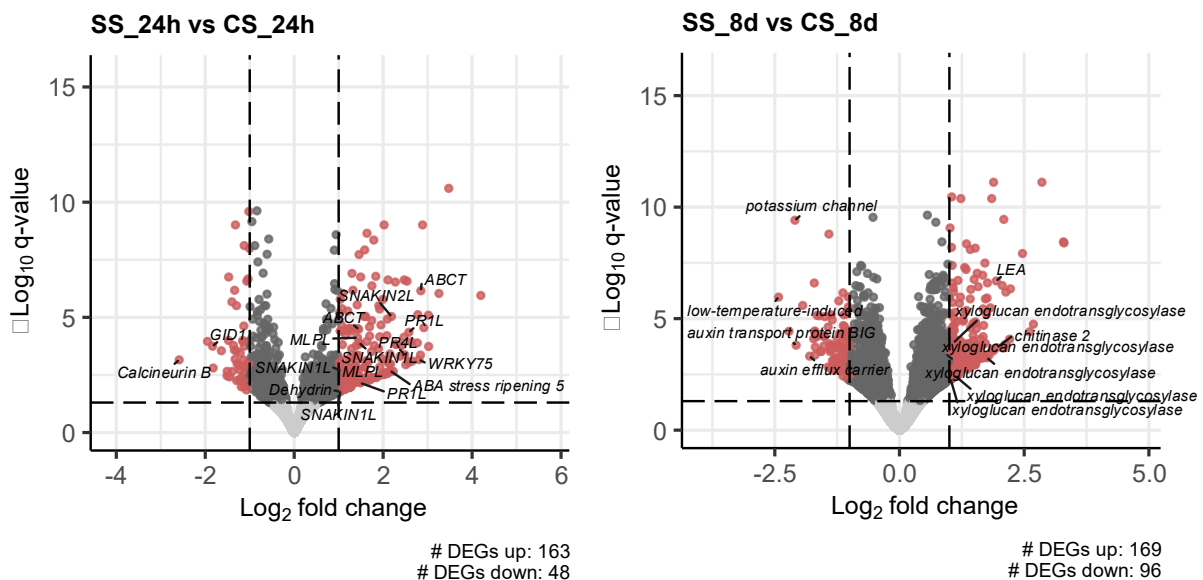


Abbildung 4.5.3: Salz-Priming führt zu einer transienten Hyperinduktion der Abwehrreaktion und einer anhaltenden Hochregulation von Genen der Zellwandbiogenese. Volcano-Plots für geprimte vs. Kontroll-Pflanzen nach 24 Stunden (links) und 8 Tagen (rechts) auslösendem Salzstress. Differenziell exprimierte Gene mit einem log₂-Fold-Change > 1 sind in Rot hervorgehoben.

Ein wichtiges Ergebnis der kombinierten epigenetischen und transkriptomischen Analysen war die Identifikation von Markergenen, welche langfristige und nachhaltige Veränderungen aufwiesen. Besonders hervorzuheben ist hierbei das Gen M82_10g024490.2 (*NRT1L*), welches sowohl veränderte Histonmodifikationen (Anreicherung von H3K4me3 und Reduktion von H3K27me3 in geprimten Pflanzen) als auch transkriptionell in geprimten Pflanzen hochreguliert war (Abb. 4.5.4). Die Verwandtschaft dieses Gens zu NRT1.5 und NRT1.8 aus *Arabidopsis thaliana*, welche für Nitrat-Transporter kodieren, die ebenfalls dynamisch auf Salzstress reagieren und zur Toleranz gegenüber Salz und anderen abiotischen Stressfaktoren beitragen (Chen et al. 2012), unterstützt dessen Rolle als Marker für das epigenetische Gedächtnis des Salzstress-Primings.

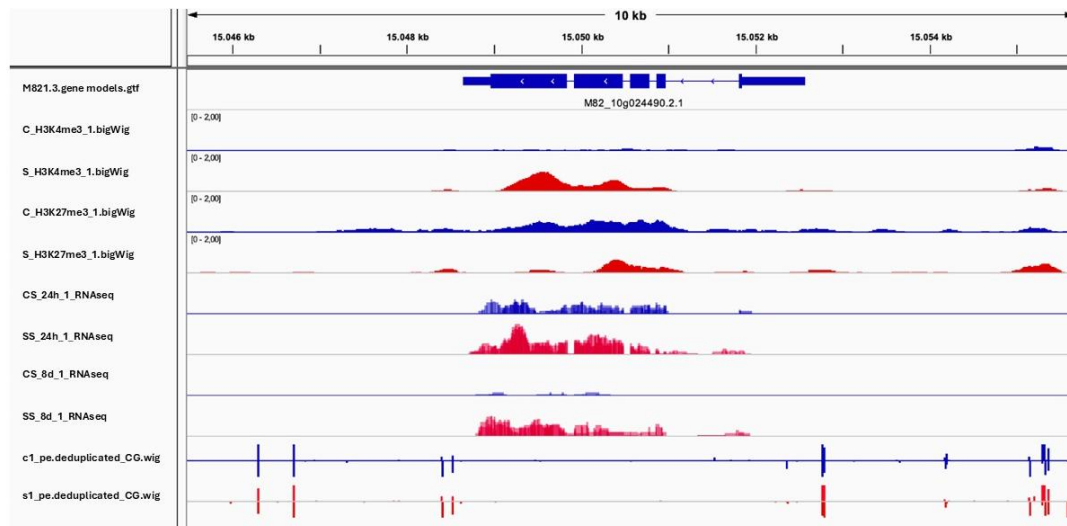


Abbildung 4.5.4: *NRT1L* ist ein potenzielles Markergen für Salz-Priming in Tomatenjungpflanzen der Sorte M82. Genome-Browser-Darstellung, Probenbezeichnung für H3K4me3 und H3K27me3 für Bericht angepasst. Salz-geprimte (S) und ungeprimte (C) Proben zur Tri-Methylierung an Lysin 4 von Histone 3 (H3K4me3), Tri-Methylierung von Lysin 27 von Histone 3 (H3K27me3) sowie mRNA-Read-Abdeckung und CG-Methylierungsniveaus am putativen Nitrattransporter *NRT1L*.

Zur Sicherstellung der Praxisrelevanz wurden die Ergebnisse der Modell-Sorte M82 auf die kommerzielle Tomatensorte Adeleza übertragen. Die Untersuchungen mittels ChIP und qPCR zeigten hier jedoch keine konsistenten Veränderungen in den H3K4me3- und H3K27me3-Markierungen an ausgewählten Kandidaten-Loci, welche sich in den vorherigen Experimenten mit M82 zwischen Salz-geprimten und Kontrollpflanzen unterschieden. Insgesamt deuten die Ergebnisse der H3K4me3 und H3K27me3 ChIP-Analysen darauf hin, dass die Histonmodifikationsmuster einerseits zwischen den einzelnen Experimenten stark variierten und sich andererseits zwischen den Sorten M82 und Adeleza unterschieden.

Um die Ergebnisse der DNA-Methylierungsanalysen mittels BS-Seq von M82 auf Adeleza zu übertragen und gleichzeitig ein diagnostisches Verfahren zu entwickeln, das nicht auf der aufwändigen und kostspieligen Hochdurchsatzsequenzierung beruht und damit auch bei höheren Probenzahlen zur Bestimmung von Priming-bedingten DNA-Methylierungsänderungen eingesetzt werden kann, wurde der KEASP-Assay etabliert (siehe 3.5 Material und Methoden für Arbeitspaket 4). In *Arabidopsis thaliana* konnte mit diesem Verfahren zuverlässig zwischen Wildtyp- und mutierten Proben unterschieden werden, basierend auf spezifischen Methylierungsmustern in dem CG-Sequenzkontext (Abb. 3.5.2. in Material und Methoden). Durch gezielte Primerdesigns und Optimierung der PCR-Bedingungen (insbesondere der Annealing-Temperatur und der Anzahl der PCR-Zyklen) zeigte sich, dass Regionen mit dichter CG-Methylierung nahe dem 3'-Ende des Primers besonders effiziente und robuste Ergebnisse lieferten. Primer wie DUF26, HAP2 und SOK3 zeigten klar unterscheidbare Methylierungsmuster, die mittels fluoreszenzbasierter Allediskriminierung eindeutig identifiziert werden konnten (Abb. 5.5A-C).

Die Übertragung dieses erfolgreichen Assays auf Tomaten erwies sich jedoch als herausfordernd. Obwohl gezielte Primerdesigns vorgenommen wurden, konnten aufgrund der komplexeren und instabileren Methylierungsmuster in Tomatenpflanzen keine verlässlichen Differenzen zwischen Salz-geprimten und Kontrollpflanzen festgestellt werden. Die schwankenden und oft transienten Methylierungsmuster, besonders im CHH- und CHG-Kontext, erschwerten es erheblich, geeignete Primerregionen zu identifizieren und eindeutige Ergebnisse zu erzielen. Trotz

umfangreicher Bemühungen, inklusive Optimierung von Primerdesigns und PCR-Bedingungen, blieb die Diskriminierung zwischen behandelten und Kontrollproben in Tomaten unzureichend, um einen robusten Markerlocus zu identifizieren und etablieren. Dies unterstreicht die Komplexität und Spezifität epigenetischer Mechanismen in unterschiedlichen Pflanzenarten und zeigt die Notwendigkeit weiterer Forschungsarbeiten, um epigenetische Untersuchungen in komplexeren Kulturpflanzen erfolgreich umzusetzen.

Zusammenfassend verdeutlichen die umfangreichen und multidimensionalen Analysen, dass Salz-Priming in Tomaten eine effektive Strategie zur nachhaltigen Verbesserung der Stressresistenz darstellt. Die identifizierten molekularen und epigenetischen Veränderungen eröffnen Perspektiven für zukünftige Anwendungen in der Pflanzenzüchtung sowie neue Ansätze zur Steuerung pflanzlicher Stressantworten durch gezielte epigenetische Modulationen.

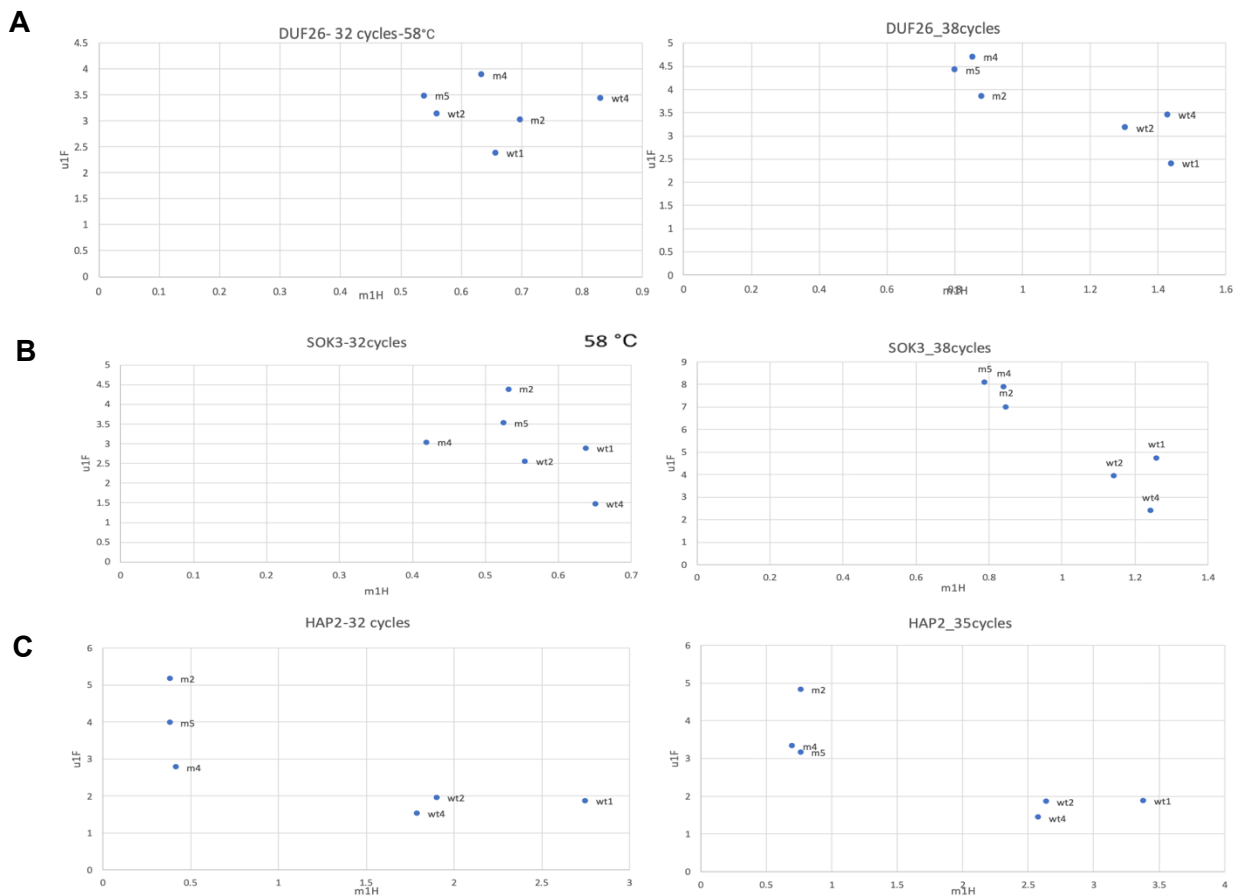


Abbildung 4.5.5: Der KEASP-Assay unterscheidet DNA-Methylierungsniveaus an Marker-Loci in *Arabidopsis thaliana*. (A) Genome-Browser-Darstellungen für Wildtyp (wtR-c) und *mthfd1* Mutanten (mR-c) Proben (je 2 Replikate) zeigen CG-Methylierungsniveaus am differentiell methylierten Marker-Locus DUF26. (B-D) Ergebnisse des KEASP-Assays an den Marker-Loci DUF26 (B), SOK3 (C) und HAP2 (D) nach unterschiedlicher Anzahl von PCR-Zyklen; mit erhöhter Zykluszahl verbessert sich die Unterscheidung zwischen methylierten und unmethylierten Proben. Die x-Achse zeigt den Rn-Wert des methylierten Epi-Allels (m1H = methylated-1-HEX); die y-Achse stellt den Rn-Wert des unmethylierten Epi-Allels dar (u1F = unmethylated-1-FAM). Der Rn-Wert ergibt sich aus dem Verhältnis der Fluoreszenz des Reportfarbstoffs zur Fluoreszenz des passiven Referenzfarbstoffs (ROX).

Ergebnisse zu Arbeitspaket 5: Arbeitspaket 5 Technologie- und Wissenstransfer in die Praxis

Im Rahmen des Projektes wurde ein Flyer (M5.1A/B), und ein Projektvideo (M5.3) veröffentlicht, mehrere Informationen über social media und Institutshomepages geteilt (M5.1A). Ein weiterer Flyer (M5.1C/D) wurde wegen der fehlenden Praxisanwendung nicht erstellt, stattdessen wurden in einigen Arbeitspaketen Infografiken zum Projekt erstellt (vgl. Diskussion AP1 und AP3), die auf den Homepages der Partner und der Hortisustain-Homepage geteilt werden sollen.

Mitglieder des Praxisbeirates nahmen an Projektmeetings teil, die über den Berichtszeitraum erfolgten. Mitglieder des Praxisbeirates, die nicht teilnahmen wurden über entsprechende Protokolle zu den Projektreffen informiert. Durch die Einbindung des praxisnahen Beirates war gesichert, dass Anwendbarkeit und Relevanz der Verfahren realitätsnah bewertet wurden.

Ergebnisse des Projektes wurden und werden in wissenschaftlichen peer-reviewten Journalen veröffentlicht und wurden auf wissenschaftlichen Konferenzen präsentiert (M5.2). Publikationslisten und andere Ergebnisse zum Wissenstransfer sind unter [10. Übersicht über alle im Berichtszeitraum erfolgten Publikationen](#) aufgeführt.

5. Diskussion der Ergebnisse

Diskussion zu Arbeitspaket 1: Priming von Tomaten-Jungpflanzen gegen abiotischen Stress

Salz-Priming konnte als eine geeignete Vorbehandlung von Jungpflanzen zur Induktion einer Stresserinnerung etabliert werden. Noch zehn Tage nach dem Ende des Primings konnte eine erhöhte Toleranz des Wachstums unter Salzstress beobachtet werden. Damit konnte die Etablierung einer tatsächlichen Stresserinnerung gezeigt werden. Auch in Brotweizen und Soja konnte ein Salz-Primingeffekt auf physiologische Parameter bei Salzstress acht Tage nach Ende des Salz-Primings gezeigt werden (Alzahrani et al. 2021; Nasrallah et al. 2022). Hier waren Photosynthesepigmente in geprimten Pflanzen weniger reduziert und auch Stressmarker reduziert. Wir konnten auch zeigen, dass zehn Tage nach dem Priming die während der Primingbehandlung erzeugte Reduktion des Wachstums nahezu aufgehoben wurde und die Erholungsphase ausreichend war, um eine Rückkehr der Reaktionen in den Zustand unbehandelter Pflanzen zu erlangen. Die veränderte Expression von Genen nach der Erholungsphase war in den durchgeführten RNA-Sequenzierungen in AP1 und AP2 sehr gering und zeigte, dass sich die Pflanzen beim Start des nachfolgenden Stresses physiologisch stark glichen. Dennoch waren die Pflanzen kleiner, so dass in der Anwendung bei der Jungpflanzenproduktion eine längere Kultivierung nötig wäre.

Nach Etablierung in der Sorte M82 konnte der Primingeffekt auch in der F1-Hybrid Sorte Adeleza gezeigt werden und somit seine mögliche Relevanz für die Tomatenproduktion belegen. Die erlangte Salzstresstoleranz könnte für Tomaten in salzigen Böden oder in Gewächshauskulturen mit steigendem EC-Werten in der Nährlösung nützlich sein. Die zusätzlich in AP2 beobachtete Steigerung der Resistenz gegen das Pilz-Pathogen *Alternaria alternata* wäre ein weiterer Schutz, der durch das Priming erreicht werden könnte. Abiotisches Priming kann auch Kreuztoleranzen gegen weitere abiotische Stresse erzeugen. So zeigten (Rossatto et al. 2023) eine verbesserte

Trockentoleranz nach Salz-Priming, UV-B Priming schützte ebenfalls vor verschiedenen abiotischen Stressen (Thomas et al. 2019). Das von uns etabliert Primingverfahren zeigte allerdings keine Kreuztoleranzen des Wachstums gegen Hitze- oder Kältestress.

In Brotweizen und Ackerbohne konnte für geprimte Pflanzen bei Salzstress verglichen zu Pflanzen die Salzstress ohne vorheriges Priming erfuhren ein verbesserter Ertrag beobachtet werden (Alzahrani et al. 2021; Nasrallah et al. 2022). Untersuchungen der Wirksamkeit des in unseren Arbeiten etablierten Primings auf Erträge und Stresstoleranz im Gewächshaus zeigten in einem Demonstrationsexperiment jedoch, dass keine anhaltenden Effekte zum Schutz der Fruchtproduktion vorlagen. Anders zeigten (Borromeo et al. 2025) kürzlich einen langanhaltenden Primingeffekt in Tomate. In dieser Studie konnte eine verbesserte Fruchtproduktion nach Samenpriming mit Polyaminen gezeigt werden, das auch noch in die nächste Generation vererbbar war. Die hier beobachtete Schutzwirkung 10 Tage nach Priming könnte in unserem Fall eher kurz nach der Priming Behandlung beim Einsetzen der Jungpflanzen nützlich sein, um sie beim ersten Anwachsen zu schützen.

Einhergehend mit der Salzstresstoleranz des Wachstums konnte eine frühe Anreicherung von Gesamtphenolen und Anthocyanen gemessen werden. Diese könnten Teil des durch Priming vermittelten Toleranz-Mechanismus sein, da phenolische Substanzen vor abiotischem Stress schützen können, indem sie zum Beispiel mit antioxidativer Wirkung toxische Sauerstoffradikale deaktivieren (Kumar et al. 2023). Eine Verbindung von verbesserter Salztoleranz durch Priming mit der Anreicherung von phenolischen Sekundärmetaboliten konnte in zwei Weizenkultivaren für ein Priming von Samen mit KCl und CaCl_2 gezeigt werden auch hier wurde eine gesteigerte Menge an Gesamtphenolen gemessen, die einherging mit besserer Keimung unter Salzstress (Islam et al. 2015). UV-B Priming bei Reis verringerte die Anreicherung von reaktiven Sauerstoffradikalen (ROS) und von Zellschäden durch Salz, dabei wurde ebenfalls gemeinsam mit weiteren antioxidativen Schutzmechanismen eine deutliche Anreicherung von Totalphenolen gemessen (Thomas et al. 2019). Ein Einfluss von Hitze-Priming an Tomaten-Keimlingen auf die Anreicherung phenolischer Inhaltsstoffe unter Salzstress konnte auch in AP3 beobachtet werden, hier zeigte sich bei Hitze-Priming eine Anreicherung von phenolischen Inhaltsstoffen und Flavonoiden (Abb. 4.3.6) und in (Körner et al. 2024a).

Die Untersuchung der Genexpression zur Untersuchung der molekularen Mechanismen des Salz-Primings zeigte eine quantitative Veränderung durch das Priming: die frühe Genexpression in geprimten Pflanzen betraf bei Salzstress eine höhere Anzahl an Genen als in den ungeprimten Pflanzen. Von diesen Genen zeigte sich der größte Teil induziert, was auf eine verstärkte Reaktion durch Induktion von schützenden Prozessen und Genen hinweisen könnte. Später nach länger anhaltendem Salzstress waren in geprimten Pflanzen weniger Gene verändert, als in ungeprimten Pflanzen, was auf einen bereits besser abgewehrten Salzstress hinweisen könnte. Während nach acht Tagen Salzstress ungeprimte Pflanzen Gene der Photosynthese herunterregulierten, waren diese in geprimten Pflanzen bei Salzstress nicht deutlich verändert, was auf eine geringere Stressauswirkung hinweist.

Die Genexpressionsstudien zeigten passend zur gesteigerten Produktion von phenolischen Sekundärmetaboliten in geprimten Pflanzen bei Salzstress, dass einige Gene mit Bezug zum phenolischen Sekundärstoffwechsel noch nach der Erholungsphase erhöht waren und sich mit Einsetzen des Salzstresses früh weiter steigern ließen. Bei dem Vergleich geprimter und ungeprimter Pflanzen unter Salzstress zeigte sich außerdem schon nach 24 Stunden Salzstress

eine signifikante Überrepräsentation des phenolischen Sekundärstoffwechsel in der Mercator Anreicherungsanalyse, während dieser erst nach 8 Tagen Salzstress auch in den ungeprimten Pflanzen als Salzstressantwort überrepräsentiert erscheint. Dadurch wurde eine frühe Induktion des phenolischen Sekundärmetabolismus in geprimten Pflanzen bestätigt.

Es konnten Gene und Prozesse unter Salzstressbedingung identifiziert werden, die klar der Priming-Stimulation zugeordnet werden können und zeigen, dass ein Priming-Memory (Priming Erinnerung) generiert wurde. Dies war zu erkennen an Genen, die sich in Salzstress durch eine deutlich veränderte Expression im Vergleich zu ungeprimten Pflanzen unter Salzstress zeigten. Primingreaktionen werden als verstärkte, schnellere oder kombinierte Reaktionen beschrieben. Es können auch völlig unabhängige Reaktionsmuster verglichen zu ungeprimten Pflanzen auftreten (Lämke and Bäurle 2017). Diese unterschiedlichen Reaktionen können gleichzeitig oder einzeln auftreten (Lämke and Bäurle 2017). Insgesamt waren beim Vergleich der Stressreaktion geprimter zu ungeprimten Pflanzen im Salzstress über 500 Gene im Rahmen der gewählten Intensitäts- und Statistik-Grenzen unterschiedlich exprimiert, was auf eine deutliche Umprogrammierung der frühen Stressreaktion durch das Priming hinweist, nach 8 Tagen Stress waren sogar über 2.000 Gene differentiell exprimiert. Dabei ist zu berücksichtigen, dass einige Prozesse eher passiv durch den Salzstress beeinträchtigt sind und andere im Kontext einer pflanzlichen Anpassungsstrategie aktiviert oder reprimiert werden, um den Salzstresseffekt zu verringern. Eine eher passive Reaktion ist die unterschiedliche Reaktion der Photosynthese-Gene in geprimten und ungeprimten Pflanzen unter Salzstress, die in ungeprimten Pflanzen reprimiert werden und in geprimten Pflanzen bei besserer Stresstoleranz nicht reagieren.

Ein Gen, das im Salzstress in geprimten Pflanzen deutlich stärker exprimiert wurde, als in ungeprimten Pflanzen unter Salzstress kodierte für ein Defensin (PDF2; m82_hg975522.1_001830.1). In *Arabidopsis thaliana* ist die durch Laminarin induzierte Salztoleranz mit einem Anstieg in der Expression eines Defensins verbunden, Überexpression dieses Defensingenes in *Arabidopsis* vermittelte eine Salztoleranz in Keimlingen (Wu et al. 2016) ebenso wird eine Induktion der *Arabidopsis* Defensine durch diverse abiotische und biotische Stresse (Domingo et al. 2024) beschrieben, die eine Funktion im Schutz vor Stressen sehr wahrscheinlich macht. So kann auch hier angenommen werden das das Defensin-Gen eine wichtige aktive Rolle im Schutz vor Salzstress vermittelt, der durch das Priming verstärkt wurde.

Um eine durch das Priming veränderte Salzstress-Reaktion zu erkennen, wurden Gene, die bei Salzstress in ungeprimten Pflanzen induziert oder reprimiert wurden mit Genen verglichen, die im Salzstress in geprimten Pflanzen stärker oder schwächer exprimiert wurden als in ungeprimten Pflanzen. Dabei konnte bei der frühen Reaktion nach 24 Stunden das Gen TAS14 identifiziert werden, das für ein Dehydrin kodiert. Dieses Dehydrin-Gen wurde auch als ein Gen identifiziert, das in der stresstoleranteren Wildtomate *Solanum pennellii* Polymorphismen im Vergleich mit der Tomatensorte M82 aufweist und auch eine höhere Expression in *S. pennellii* als in M82 aufweist und so eine Rolle in der höheren Stresstoleranz der Wildtomate spielen könnte (Bolger et al. 2014a). Weiterhin wurde gezeigt, dass eine Überexpression von TAS14 Tomaten salztoleranter machen kann (Muñoz-Mayor et al. 2012). Die veränderte, verstärkte Induktion der Expression von TAS14 könnte also maßgeblich zur Verbesserung der Salztoleranz in den geprimten Pflanzen beitragen.

Die Kategorie der NRT-Nitrat-Transporter ist in der Salzstressantwort der ungeprimten Pflanzen überrepräsentiert (CS vs. CC 24h, Tabelle A4.1.3). Ein NRT Transportergen

(m82_hg975522.1_001830.1) war verglichen mit den ungeprimten Pflanzen im Salzstress durch das Priming verstärkt exprimiert. Man kann hierbei von einer durch Priming induzierten Steigerung dieses Genes ausgehen, das außerdem epigenetisch markiert vorlag (AP4, Abb. 4.5.4) und so einen längerfristigen Priming-Effekt zeigen könnte. NRT-Gene werden als salz-induziert beschrieben (Xiong et al. 2023; Zhao et al. 2022) und ihre Überexpression in der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* kann Salztoleranz vermitteln (Xiong et al. 2023), während ein Defekt im Gen NRT1.8 in *A. thaliana* zu erhöhter Salzempfindlichkeit führt (Chen et al. 2012). Ein möglicher Mechanismus der Salztoleranz könnte dabei durch vermehrte Aufnahme von Nitrat zur Aufrechterhaltung des osmotischen Potenziales bei Salzstress sein (You et al. 2020). Untersuchungen von geprimten und salzgestressten Pflanzen in einem Demonstrationsexperiment zeigten aber keine Änderung der Expression dieses NRT-Genes in salz-gestressten Pflanzen, der Priming-Effekt hielt also nicht von der Jungpflanzen-Behandlung bis zur Tomatenproduktion an. Eine überempfindliche Reaktion auf Stresse, wie sie durch das Priming programmiert wird, ist nicht immer von Vorteil sie kann die Entwicklung der Pflanze behindern und Erträge vermindern (Crisp et al. 2016). Deshalb verfügen Pflanzen auch über sogenannte „resetting“-Mechanismen, die eine Erinnerung auch wieder auflösen können. Eine gute Balance zwischen Erinnerung und „Vergessen“ ist für die Pflanzen dabei essentiell (Crisp et al. 2016). Ein solches „Resetting“ der epigenetischen Modifikationen könnte hier stattgefunden haben.

In AP2 konnte eine Auswirkung des Salz-Primings auf Salzstress und auch auf die Reaktion auf Pathogene gezeigt werden. Auch wenn eine Wirksamkeit des hier untersuchten Primingverfahrens auf weitere Stresse und in der Fruchtproduktion nicht gezeigt werden konnte, besteht die Möglichkeit das zukünftig abiotischer Stress für die Induktion eines Primings eingesetzt werden könnte. Die Möglichkeit, geprimte von ungeprimten Pflanzen zu unterscheiden ist deshalb grundsätzlich von Interesse für solche Verfahren. Wir konnte durch die Farbanalyse aus dem Bild-analytischen Verfahren über den hue Wert das Priming anzeigen, dieser lag noch nach 10 Tagen Erholung deutlich über dem Wert ungeprimter Pflanzen. Auch für die Messungen mit dem Dualex konnten nach der Erholungsphase Unterschiede in Fluoreszenz-Indices beobachtet werden, diese Effekte ließen allerdings mit längerem Wachstum in Kontrollbedingungen nach. Alle Indices des Dualex belegten eine pflanzliche Reaktion auf den Priming-auslösenden Stress und könnten zu seiner Quantifizierung und zur Dosierung des Primingstresses genutzt werden.

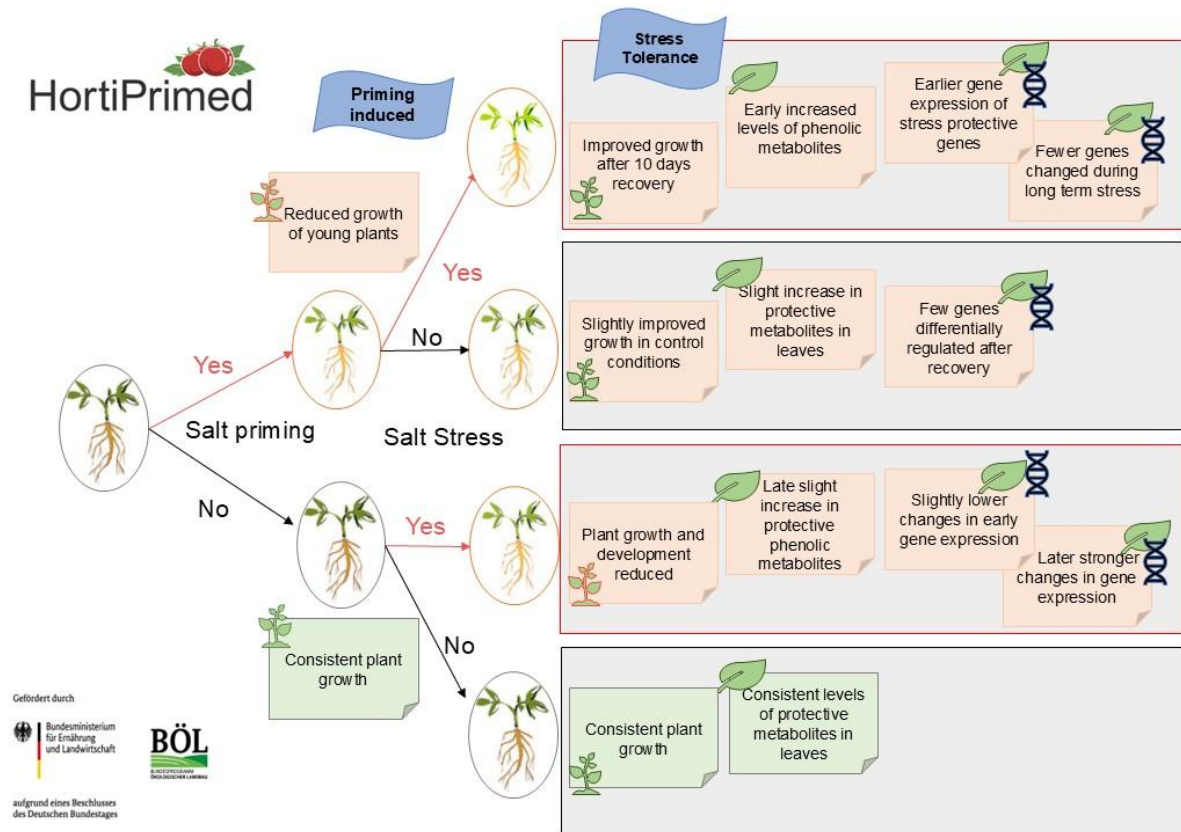


Abb. 5.1. Infografik zur Zusammenfassung der Ergebnisse aus AP1.

Diskussion zu Arbeitspaket 2: Priming gegen biotischen Stress/Schadorganismen

Als geeignete Priming-Behandlung zeigte sich insbesondere die 5-tägige Behandlung von Tomatenjungpflanzen auf Steinwolle in Hoagland Medium mit 200 mM NaCl. Nach einer nachfolgenden 10-tägigen Erholungsphase, zeigten sich Tomatenjungpflanzen der Sorten M82 und (in 2 von 3 Versuchen) Adeleza resistenter gegen Infektionen mit dem Pilz-Pathogen *Alternaria alternata*. So schützte die Salz-Behandlung die Pflanzen nicht nur *in cis* vor den Folgen eines nachfolgenden Salzstress (AP1 – *cis*-Priming) sondern auch *in trans* vor den Folgen eines nachfolgenden anderen Stresses, in diesem Fall die von *A. alternata* verursachte Dürffleckenkrankheit auf Blätter (AP2 – *trans*-Priming). Interessanterweise bestätigten die durchgeführten RNA-Sequenzierungsversuche in den APs 1 und 2, dass die Salz-Behandlung eine richtige Priming-Reaktion hervorrief, welche mit hoher Wahrscheinlichkeit zum Schutz der Pflanzen vor *A. alternata* führte.

Allerdings ließ sich ein vom Salz-Priming hervorgerufenen Schutz bei zwei weiteren Krankheitserregern, dem Grauschimmelpilz *Botrytis cinerea* und dem Erreger der bakteriellen Fleckenkrankheit, *Pseudomonas syringae*, nicht nachweisen. Positiv hervorzuheben, bleibt dabei allerdings, dass das Salz-Priming die M82 Pflanzen zwar nicht resistenter gegen aber auch nicht signifikant anfälliger für die beiden getesteten Krankheitserregern machte. So kann im vegetativen Wachstumsstadium der Tomatenpflanzen nach wie vor von einem Vorteil des Salz-Primings ausgegangen werden, in Sorten, welche mit einer erhöhten Resistenz gegen *A. alternata* in den Blättern reagieren.

Langzeitexperimente zeigten, dass das Salz-Priming weder das Wachstum noch die Blüte der M82 Pflanzen merkbar beeinflussten, jedoch die Früchte anfälliger für eine *A. alternata* Infektion machte. Obwohl diese Experimente im Laufe des Jahres 2025 wiederholt werden, ist es zum aktuellen Zeitpunkt erforderlich von einem eventuellen *Trade Off* Effekt des Salz-Primings auszugehen, bei dem die Immunität der Früchte ggf. eingeschränkt bleibt.

Die Genreaktionen der M82-Pflanzen auf das Salz-Priming sowie auf Infektionen mit *A. alternata*, *B. cinerea* und *P. syringae* legen nahe, dass die Tomate mit vergleichbaren phytohormonellen Reaktionen auf den beiden Pilz-Pathogenen aber unterschiedlich auf *P. syringae* reagiert. Dies bestätigt die Hypothese, dass *A. alternata* und *B. cinerea* ähnliche Vermehrungsstrategien in ihren Wirtspflanzen nutzen und somit ähnliche Abwehrprogramme auslösen. *P. syringae* weist einen unterschiedlichen Lebenszyklus auf und löste in diesem Projekt eine unterschiedliche Reaktion des JA-Markers *PDF1.2* aus. Die Reaktion dieses Gens, bzw. Signalweges, ist im Hinblick auf den Stand des Wissens in *Arabidopsis thaliana* unerwartet und führt zu weiteren Forschungsfragen im Bereich Immunität in Tomaten. Darüber hinaus zeigten die RNA-Sequenzierungsdaten einen deutlichen Anstieg des Salizylsäure-Signalweges nach *A. alternata* Infektion der Pflanzen, eine Reaktion, die in *A. thaliana* mit *P. syringae* aber nicht mit *Alternaria* Pilzen in Verbindung gebracht wird. Aus diesem Grund planen wir die RNA-Sequenzierungsdaten aus diesem Projekt in naher Zukunft zu nutzen, um Immunreaktionen in Tomaten besser zu verstehen; beispielsweise sind CRISPR-Cas Genom-Editierungsexperimente geplant mit Zielgenen, welche aus den RNA-Sequenzierungsdaten hervorgehen und deren Mutation die Immunität von Tomatenpflanzen möglicherweise über ein „*Dauerpriming*“ erhöht.

Insgesamt lässt sich schlussfolgern, dass das Salz-Priming Tomatenpflanzen im vegetativen Wachstumsstadium und sortenabhängig vor *A. alternata*-Infektionen schützen kann. Wenn sich das Priming positiv auf den Fruchtertrag bei abiotischem Stress auswirken würde, wäre es dennoch erforderlich die Früchte anderweitig vor einer Infektion mit der Dürrfleckenkrankheit zu schützen, um eine eventuell vermehrte, krankheitsbedingte Beschädigung der Früchte in Salz-Priming Pflanzen vorzubeugen.

Diskussion zu Arbeitspaket 3: Priming und Priming-Effekte während der Fruchtproduktion (Hochschule Geisenheim)

Hitze-Priming konnte als primende Vorbehandlung an Tomatenkeimlingen etabliert werden. Als geeignete Hitzebehandlung (Hitze-Priming) zur Abhärtung bei nachfolgenden Stressbedingungen an 7 Tage alten Tomaten zeigte sich insbesondere die 90-minütige Hitze-Behandlung (am Tag mit einer Behandlungsdauer über insgesamt 7 Tage) als besonders vielversprechend (Experiment 2). Zum einen wurde bei dieser Primingdauer pro Tag bei den Tomatenkeimlingen der Sorte ‚Adeleza F1‘ eine signifikante Anreicherung von oxidativ protektiven Blatinhaltsstoffen (Flavonoiden) induziert (Körner et al., 2024a), wie zuvor bei (Falcone Ferreyra et al. 2012) beschrieben. Zum anderen zeigte sich eine tendenziell erhöhte Anzahl an Infloreszenzen um bis zu 15 % im Vergleich zur nicht geprimten Kontrolle. Die Blütenentwicklung wurde demnach durch ein angemessenes Hitze-Priming beschleunigt, wie bei vorherigen Studien dargelegt (Javanmardi et al. 2014; Olas et al. 2021).

Allerdings ging diese Anreicherung von sekundären Inhaltsstoffen auf Kosten des primären Metabolismus, wie von Martinez-Medina et al. (2016) beschrieben, und führte somit zu einer verzögerten vegetativen Entwicklung (Fan et al., 2018; Olas et al., 2021; Wang et al., 2014). Die grundsätzlich erfasste Wachstumssteigerung (Hypokotylverlängerung) als initiale Reaktion im direkten Anschluss an das Hitze-Priming kann der Hitzeeinwirkung auf das Phytohormon Auxin (Thermomorphogenese) zugeschrieben werden (Li et al. 2021a).

Gepriimte Pflanzen erholten sich vermutlich schneller von diesem initialen Hitzeschock ohne nachhaltige negative Auswirkungen zu erleiden, da sie dem Hitzestress ausschließlich in der frühen Entwicklungsphase als Keimlinge ausgesetzt waren. Dies könnte einen weniger gravierenden Einfluss auf die Ertragsleistung dieser Pflanzen haben als Hitzestress während der Blütephase oder bei anhaltender milder Hitzeeinwirkung (Driedonks 2018).

Auch in einem späteren Entwicklungszustand der Tomaten (Experiment 1 und 2, Abb.4.3.6) steigerte Hitze-Priming bei nachfolgenden Stressbedingungen zeitweise die Pflanzenabwehr in Form von erhöhten Gehalten schützender Blatinhaltsstoffe wie Phenolen und untergruppierten Flavonoiden bei hitzeinduziertem, oxidativem Stress (Körner et al. 2024b, c), wie bei Fan et al. (2018) beschrieben.

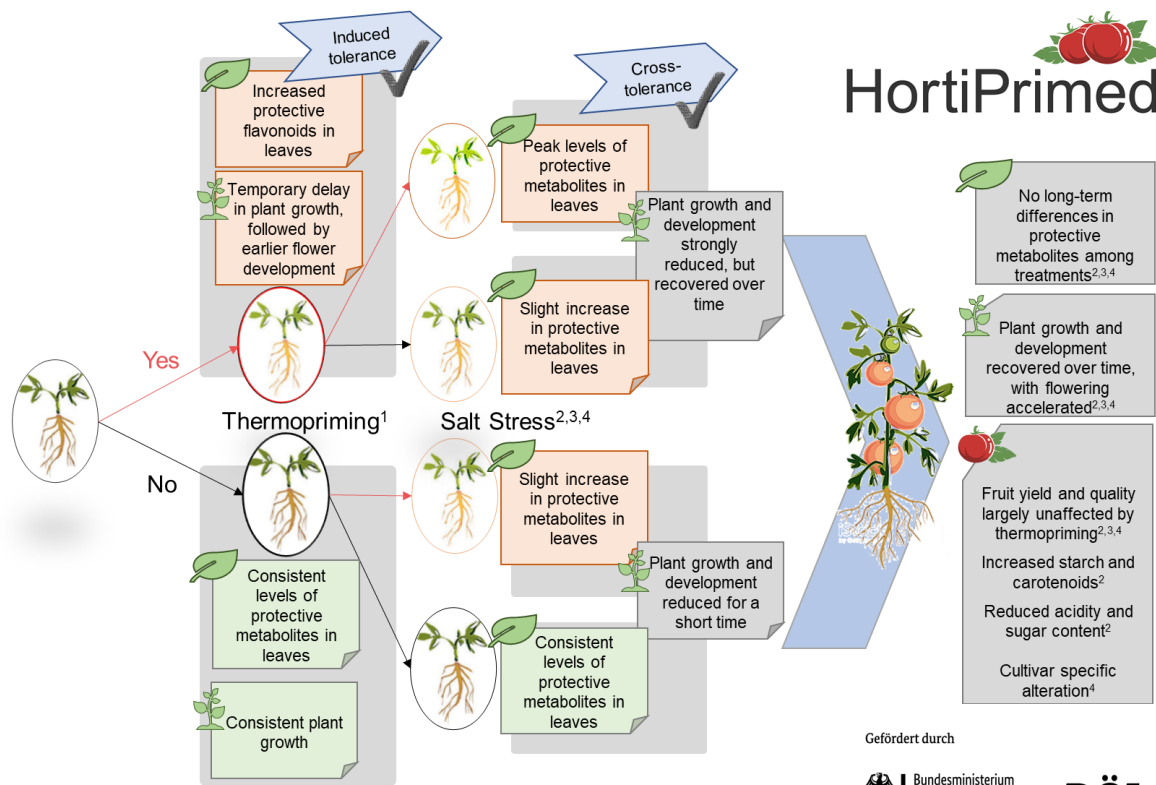
Anschließend an eine tendenziell gesteigerte Blütenbildung in Experiment 1 kam es zu einer verzögerten Fruchtbildung durch Hitze-Priming, die ab der 10. Woche nach Priming Stimulus wieder abfiel, so dass kein Unterschied im Gesamtertrag erfasst wurde (Körner et al. 2024c; Körner et al. 2024a). Dies steht in Übereinstimmung mit vorherigen Studien zu Hitzestressauswirkungen auf die Fruchtbildung von Tomaten (Delgado-Vargas et al. 2023; Espley and Jaakola 2023).

In Bezug auf die Fruchtqualität zeigte sich in Experiment 3, dass geprimte und zweimal Salz-gestresste Pflanzen einen erhöhten Gehalt an Carotinoiden (+38% im Vergleich zu ungeprimten Pflanzen) aufwiesen (Körner et al. 2024a). Dennoch führte das Hitze-Priming und der Salzstress nicht zu einer Akkumulation von phenolischen Verbindungen in den Früchten, sondern vielmehr zu einer Reduktion des Gehalts an Gesamtsäure und -zucker (Glukose und Fruktose) in den Früchten. Zudem wurde eine erhöhte Gesamtcarotinoidkonzentration (TCarC) beobachtet, die unter oxidativem Stress als schützende Antioxidantien akkumuliert werden. Im Gegensatz zu anderen Studien konnten jedoch keine erhöhten Gehalte an Ascorbinsäure (ASC) oder Flavonoiden (FCs) in den Früchten festgestellt werden. Dies könnte auf saisonale Effekte, die genetische Grundlage der Tomatensorte sowie die Kombination verschiedener Stressfaktoren zurückzuführen sein (Botella et al. 2021; Massaretto et al. 2018; Murshed et al. 2014; Zushi et al. 2022).

Der Vergleich der Tomatensorten ‚Saint Anna F1‘, ‚Bronski F1‘, ‚Dunk F1‘ und ‚Goudski F1‘ mit der Standardsorte ‚Adeleza F1‘ zeigte deutliche Sortenunterschiede hinsichtlich der Primingwirkung auf (Körner et al. 2025). Dies deutet daraufhin, dass genotypische Sorteneffekte auf Hitze (Shaheen et al. 2016) eine maßgebliche Entscheidungsgrundlage für den grundlegenden Einsatz eines Hitze-Primings spielen.

Die Übertragung der experimentellen Anbauversuche in die Praxis als Demonstrationsversuch am Versuchszentrum Gartenbau der Landwirtschaftskammer NRW zeigte, dass die Sorte ‚Adeleza‘ deutliche Ertragseinbußen unter Hitze und insbesondere Salzstress aufwies (Abb. 4.3.12). Es ließen sich allerdings keine Primingeffekte hinsichtlich einer gesteigerten Toleranz gegenüber diesen Folgestressen feststellen. Dies ist vermutlich auf die lange Zeitspanne zwischen initialem Priming Stimulus in Geisenheim bzw. Jülich und den Folgestressbedingungen in Straelen zurückzuführen.

In Zukunft könnte das Hitze-Priming eine nachhaltige und umweltfreundliche Pflanzenschutzstrategie unterstützen, die im Einklang mit Ziel 2 der nachhaltigen Entwicklungsziele steht (Ross 2023).



¹ Körner et al. (2024): Induction of Time-Dependent Tolerance through Thermopriming in Tomatoes. *Sustainability*. DOI: <https://doi.org/10.3390/su16031163>.

² Körner et al. (2024): Heat-Induced Cross-Tolerance to Salinity Due to Thermopriming in Tomatoes. *Metabolites*. DOI: <https://doi.org/10.3390/metabo14040213>.

³ Körner et al. (2024): Thermopriming Induces Time-Limited Tolerance to Salt Stress. *Int. J. Mol. Sci.* DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms25147698>.

⁴ Körner et al. (2025): Plant Growth and Metabolic Responses of Tomato Varieties to Salinity Stress After Thermopriming. *Stresses*. DOI: <https://doi.org/10.3390/stresses5020027>.

Gefördert durch



aufgrund eines Beschlusses
des Deutschen Bundestages

Abb. 5.2. Infografik zur Zusammenfassung der Ergebnisse aus AP3.

Diskussion zu Arbeitspaket 3: Priming und Priming-Effekte während der Fruchtproduktion (Uni Bonn)

Konzeptionelles Modell

Die Ergebnisse des umweltkonzeptuellen Modells deuten darauf hin, dass das Priming mit zusätzlichen Umweltkosten verbunden ist. In diesem Projekt wurde das Priming im zweiten Blattstadium angewendet, was in der konventionellen Jungpflanzenproduktion dem Stadium des üblichen Veredelungsverfahrens entspricht, eine Praxis, die für über 90 % der Tomaten in Deutschland angewandt wird. Genaue Daten über die mit einem Primingeffect verbundenen Emissionen wären wertvoll, um die Umweltauswirkungen der konventionellen Tomatenproduktion mit denen eines Primingeffects zu vergleichen.

Probabilistisches Modell

Die Differenz des Kapitalwerts (NPV) spiegelt die wirtschaftlichen Nettoauswirkungen des Primings wider, wobei sowohl die Kosten als auch der Nutzen berücksichtigt werden, die je nach Umweltbedingungen und Pflanzenreaktionen variieren. Unter Stressbedingungen deuten die meisten NPV-Unterschiede auf einen leichten wirtschaftlichen Vorteil bei geprimten Tomaten hin. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Landwirte unter widrigen Umweltbedingungen mit größerer Wahrscheinlichkeit einen höheren wirtschaftlichen Nutzen aus geprimten Pflanzen erzielen. Interviews mit deutschen/nationalen Landwirten zeigen jedoch, dass Salzstress durch den Einsatz von Bewässerungsfiltersystemen nur selten auftritt. Im Gegensatz dazu werden Ertragsverluste häufiger auf höhere Nachttemperaturen (über 25 °C) zurückgeführt. Daher ist die Einbeziehung von Wetterdaten in zukünftige Studien unerlässlich, um die mit hohen Temperaturen verbundenen Risiken zu bewerten und besser zu verstehen, wie sich diese Bedingungen auf die Tomatenproduktion mit Priming auswirken. Diese Forschung kann die Bedeutung von vorbereiteten Tomatenpflanzen für die Milderung von Hitzestress und die Verbesserung der wirtschaftlichen Ergebnisse für die Landwirte hervorheben.

Die Ertragsvariablen, sowohl mit als auch ohne Priming, weisen hohe VIP-Werte (>1) auf, was darauf hindeutet, dass die Entscheidungsergebnisse sehr empfindlich auf diese Faktoren reagieren. Dementsprechend unterstreichen die erhöhten EVPI-Werte den signifikanten Einfluss der Rendite auf die wirtschaftlichen Ergebnisse. Dies deutet darauf hin, dass eine Verbesserung der Genauigkeit der Ertragsdaten die Entscheidungsfindung erheblich verbessern und die Unsicherheit in Tomatenproduktionssystemen verringern könnte. In wirtschaftlicher Hinsicht stellt EVPI den maximalen Betrag dar, den ein Entscheidungsträger bereit wäre zu investieren, um perfekte Informationen über eine bestimmte Variable zu erhalten (Hubbard 2014).

Die Integration von Ertragsdaten von geprimten Tomatenpflanzen in die Praxis ist entscheidend, um die zukünftige Forschung zur Produktion von geprimten Tomaten voranzutreiben. Diese Integration wird die Genauigkeit der Daten verbessern, Unsicherheiten reduzieren, die Entscheidungsfindung verbessern und letztendlich die Produktionsstrategien für bessere wirtschaftliche Ergebnisse optimieren.

Diskussion zu Arbeitspaket 4: Molekulare Bestimmung des Primings

Die Ergebnisse aus AP1 und AP2 zeigen, dass Salz-Priming bei Tomatenjungpflanzen zu einer deutlichen Steigerung der Toleranz gegenüber biotischem und abiotischem Stress führt. Insbesondere wurde eine erhöhte Resistenz gegenüber dem Pathogen *Alternaria alternata* beobachtet, die mindestens zwei Wochen anhielt. Zudem zeigte sich, dass geprimte Pflanzen bei erneutem Salzstress bessere Wachstumsraten und eine verstärkte Akkumulation phenolischer Substanzen aufwiesen. Diese Anpassungen unterstützen das Konzept des „Defense Primings“, bei dem Pflanzen nach einem initialen Reiz schneller und effektiver auf nachfolgende Stresssituationen reagieren können.

Auf molekularer Ebene waren diese physiologischen Verbesserungen von einem spezifischen Expressionsmuster begleitet: zunächst erfolgte eine transiente, verstärkte Induktion von Abwehrgenen, gefolgt von einer nachhaltigen Hochregulation von Genen, die in die Zellwandbiogenese eingebunden sind. Dies erklärt sowohl die beobachtete kurzfristige Pathogenresistenz als auch die langfristigen Wachstums- und Stressvorteile. Der Vergleich dieser Ergebnisse mit aktuellen Studien bestätigt, dass Stresspriming bei Pflanzen häufig solche Genexpressionsmuster hervorruft, die zu einer verbesserten Stressbewältigung beitragen (Lämke et al. 2016; Wibowo et al. 2016).

Ein zentrales Ziel von AP4 war es, die molekulare Basis dieser verbesserten Stressantwort genauer zu verstehen, wobei insbesondere das epigenetische Stressgedächtnis im Fokus stand. Dazu wurden zunächst umfangreiche methodische Vorarbeiten geleistet, um ChIP-seq-Analysen (H3K4me3, H3K27me3) und WGBS-basierte DNA-Methylierungsanalysen an Tomatenblättern durchführen zu können. Diese Optimierungen waren notwendig, da Pflanzenmaterial durch sekundäre Metabolite methodische Herausforderungen mit sich bringt. Trotz anfänglicher Schwierigkeiten konnten qualitativ hochwertige Datensätze erzeugt werden, was die Robustheit der entwickelten Protokolle und Bioinformatik-Pipelines belegt.

Die epigenetischen Analysen zeigten deutlich, dass Salz-Priming spezifische Änderungen im Epigenom auslöst, deren Charakter sich über die Zeit hinweg verändert. Kurz nach dem Priming dominierten aktivierende Histonmodifikationen (H3K4me3), während nach längerer stressfreier Zeit zunehmend repressive Histonmarkierungen (H3K27me3) überwogen. Bemerkenswert war die geringe Übereinstimmung der Priming-spezifischen Peaks zwischen den unterschiedlichen Versuchsbedingungen (Erde vs. Hydroponik, unterschiedliche Erholungszeiten). Ebenso zeigte sich eine ähnliche Situation bei der DNA-Methylierung, wo differenziell methylierte Regionen (DMRs) zwischen Versuchen kaum überlappten. Diese Befunde weisen auf die hohe Dynamik und Kontextabhängigkeit epigenetischer Stressgedächtnisprozesse hin, ein Aspekt, der in aktuellen Modellen des epigenetischen Gedächtnisses intensiv diskutiert wird (Wibowo et al. 2016; Lämke et al. 2016). Solche Ergebnisse bedeuten, dass Priming-Effekte zwar molekulare Spuren hinterlassen, diese jedoch stark von Umweltbedingungen beeinflusst werden und daher nicht ohne weiteres verallgemeinerbar sind.

Trotz dieser Variabilität konnten robuste molekulare Marker für Priming identifiziert werden. Ein besonders interessantes Gen, *NRT1L*, erwies sich als Kandidat für ein stabiles Priming-Gedächtnis: Es zeigte gleichzeitig eine langanhaltende Änderung der H3K27me3-Histonmarkierung und eine nachhaltig erhöhte Expression nach erneutem Salzstress. Die Verwandtschaft dieses Gens zu den Nitrat-Transportern NRT1.5 und NRT1.8 aus *Arabidopsis*

thaliana, die zu einer Toleranz gegenüber Salz und anderen abiotischen Stressfaktoren beitragen (Chen et al. 2012), unterstreicht die Bedeutung dieses Befundes und eröffnet die Möglichkeit, solche molekularen Marker für die praktische Nutzung von Priming-Effekten zu etablieren.

Eine Herausforderung für die praktische Anwendung des Salz-Primings ergibt sich aus der hohen Sensitivität der molekularen Priming-Effekte gegenüber experimentellen Bedingungen. Die unterschiedlichen Ergebnisse je nach Substrat oder Erholungsphase zeigen deutlich, dass eine sorgfältige Standardisierung der Versuchsbedingungen entscheidend ist, um reproduzierbare Effekte zu erzielen. Insbesondere die geringe Überlappung epigenetischer Veränderungen zwischen Versuchen erschwert die Entwicklung zuverlässiger Biomarker für die Praxis. Hinzu kommt, dass epigenetische Veränderungen nicht zwangsläufig zu direkten Veränderungen der Genexpression führen müssen; die Übereinstimmung zwischen epigenetischen Markierungen und transkriptomischen Veränderungen war in AP4 gering. Dies verdeutlicht, wie komplex die Beziehung zwischen epigenetischen Modifikationen und funktionellen physiologischen Effekten tatsächlich ist.

Im Vergleich zur aktuellen Literatur bestätigen die Ergebnisse aus AP4 viele der bisherigen Befunde zum epigenetischen Gedächtnis in Pflanzen, insbesondere dessen dynamische und reversible Natur (Wibowo et al. 2016). Die beobachtete verstärkte H3K27me3-Modifikation nach längerer stressfreier Zeit könnte auf Mechanismen hinweisen, die in der Literatur als „poised“ oder vorbereitete Chromatinzustände beschrieben werden und bei Bedarf eine rasche Aktivierung oder Repression ermöglichen (Lämke et al. 2016). Diese Mechanismen wurden bereits in anderen Pflanzenarten beschrieben und könnten in der Tomate ähnliche adaptive Funktionen erfüllen.

Gleichzeitig erweitern die AP4-Ergebnisse den aktuellen Forschungsstand, indem sie spezifische Kandidaten und molekulare Mechanismen des Stressgedächtnisses in einer wichtigen Kulturpflanze (Tomate) identifizieren. Dies eröffnet neue Perspektiven für die zukünftige Nutzung von Salz-Priming als nachhaltige Pflanzenschutzstrategie. Allerdings bleibt die konkrete Anwendbarkeit vor allem durch die identifizierten methodischen und biologischen Herausforderungen limitiert: Eine sorgfältige Standardisierung von Priming-Bedingungen und ein tiefgehendes Verständnis der molekularen Grundlagen bleiben essenziell, um verlässliche und vorhersehbare Effekte in der Praxis zu gewährleisten.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse aus AP4 deutlich, dass Salz-Priming bei Tomaten einen nachweisbaren, zeitlich begrenzten Schutz gegenüber verschiedenen Stressarten bietet und auf molekularer Ebene durch dynamische epigenetische Modifikationen vermittelt wird. Zukünftige Forschungsarbeiten sollten sich darauf konzentrieren, diese epigenetischen Veränderungen weiter zu charakterisieren, deren Stabilität unter praxisnahen Bedingungen zu überprüfen und daraus praxistaugliche Biomarker abzuleiten. Trotz der noch offenen Fragen bilden die vorliegenden Resultate eine wichtige Grundlage, um Salz-Priming künftig als praktische Methode im Pflanzenschutz gezielt und effizient einzusetzen.

6. Angaben zum voraussichtlichen Nutzen und zur Verwertbarkeit der Ergebnisse

Die Anwendung von Priming als nicht-chemischer Pflanzenschutz hat das Potenzial, ökonomische und ökologische Vorteile für die Tomatenproduktion zu schaffen. Im Rahmen des Projektes HortiPrimed wurde das Priming bei Tomaten praxisnah untersucht – von der Jungpflanzenproduktion über die vegetative Entwicklung bis hin zur Fruchtproduktion – und dabei sowohl auf molekularer Ebene als auch aus gartenbauwissenschaftlicher Perspektive erforscht und durch Modellierungen unterstützt.

Wissenschaftlicher Nutzen:

Das Phänomen ‚Priming‘ steht seit mehreren Jahren zunehmend im Fokus der wissenschaftlichen Forschung. Seit Einreichen des Antrages im Jahr 2020 sehen wir eine große Steigerung in der Veröffentlichung von Forschungsergebnissen zum Thema „priming stress AND tolerance“ (Abb. 6.1). Der Anteil der Forschung zu Priming und Stresstoleranzen in Tomate („AND tomato“) ist dabei mit 13 Publikationen im Jahr 2024 vergleichsweise gering. Das Projekt HortiPrimed hat dazu allein schon im Jahr 2024 drei Veröffentlichungen beigetragen. Insgesamt sind bis Mai 2025 bereits sechs Publikationen aus dem Projekt HortiPrimed veröffentlicht. Dies verdeutlicht, dass dieses Verbundprojekt bereits einen wichtigen Beitrag zum Verständnis von Priming, besonders zur Tomate als einem der bedeutendsten Gemüse, beigetragen hat. Weitere Publikationen sind in Vorbereitung und werden der Fachwelt u.a. molekulare Grundlagen von Priming in Tomate darstellen.

Markergene und epigenetische Markierungen wurden in Jungpflanzen bei vorherrschendem Primingeffekt auf Salzstress oder die Infektion durch *A. alternata* identifiziert. Diese Gene korrelieren zu Toleranz gegen Salzstress und Resistenz gegenüber *A. alternata*. Kenntnis über diese Gene wird helfen, salz-tolerante und gegen *A. alternata* resistente Sorten zu züchten. Ein molekulares Nachweisverfahren für länger anhaltende epigenetische Veränderungen, welches im Rahmen von HortiPrimed etabliert wurde, kann für künftige Diagnose- und Selektionsverfahren anhand epigenetischer Marker eingesetzt werden.

Die Erkenntnisse zum Hitze-Priming können als Ausgangslage für zukünftige Projektideen dienen, die darauf abzielen, die Auswirkungen der vom IPCC prognostizierten zunehmenden Hitzewellen auf Kulturpflanzen zu analysieren und durch den Einsatz praxistauglicher Biomarker stressresistente Sorten zu identifizieren und die Züchtung diesbezüglich zu unterstützen. Ergänzend sollten umfassende Feldstudien und moderne Analysemethoden eingesetzt werden, um praxisrelevante Strategien für die Anpassung von Kulturpflanzen an veränderte klimatische Rahmenbedingungen zu entwickeln. Dabei könnte unter anderem der etablierte Beleuchtungswagen zum Einsatz kommen, um Hitzebedingungen im Gewächshaus an Modellpflanzen, wie Tomaten oder Gurken, nachzustellen.

Zur Quantifizierung des Wachstums von Jungpflanzen und der Effekte angewandter Priming-Stressoren kamen Phänotypisierungstechniken zum Einsatz. Diese Methoden können auch künftig sowohl zur Entwicklung weiterer Priming-Ansätze mittels kontrollierter Stressbehandlungen als auch zur Bewertung (a)biotischer Stresstoleranzen sowie pflanzlicher Anpassungs- und Abwehrreaktionen verwendet werden.

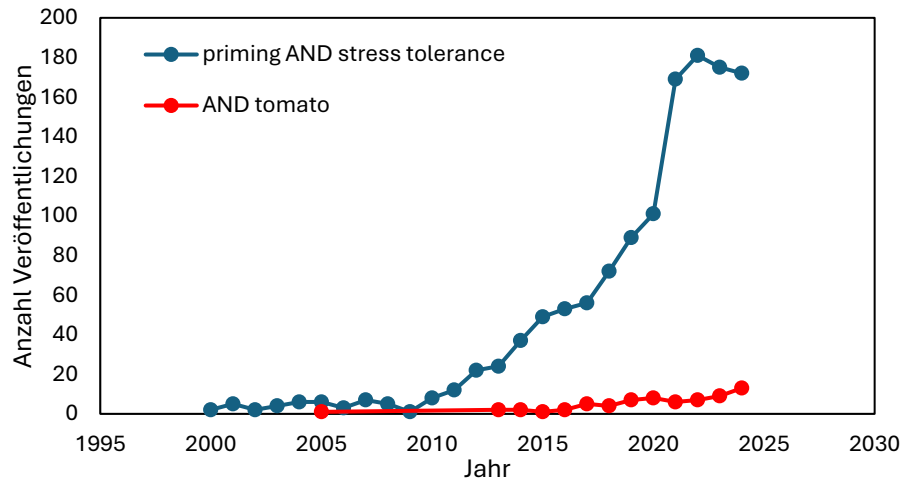


Abb.6.1 Anzahl Veröffentlichungen zu den Schlagwörtern „priming“ und „stress tolerance“ ermittelt über pubmed NIH (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/advanced/>) bis in das Jahr 2024. Außerdem wurde zusätzlich zu dem Schlagwort „tomato“ gesucht (rote Markierung).

Wirtschaftlicher Nutzen:

Im Projekt konnten wir in Jungpflanzen Primingeffekte durch Salzstress mit schützender Wirkung vor Salzstress und Infektion durch *Alternaria alternata* erzeugen, deren Effektivität längerfristig in fruchttragenden Tomatenpflanzen jedoch nicht anhielt oder gering war. Im Gegenteil deutet sich eine höhere Empfindlichkeit von Früchten gegen eine Infektion an. Weitere negative Effekte für die Tomatenproduktion entstanden allerdings nicht, Ernteerträge blieben durch das Priming unbeeinflusst. Demnach ist durch die Nutzung des Salz-Primingverfahren kein wirtschaftlicher Vorteil gegeben. Auch das Hitze-Primingverfahren erwies sich als wirtschaftlich nicht vorteilhaft, da die festgestellte Wirkung als Abhärtungsstrategie gegenüber abiotischem Stress nicht ausreichend überzeugend für eine praxisrelevante Anwendung war. Grundsätzlich bestätigen jedoch erhöhte Gehalte antioxidativer Blatinhaltsstoffe, dass eine pflanzliche Reaktion ausgelöst werden konnte, die der Vorbereitung auf nachfolgende Stressbedingungen dient.

Ein Modell zur Evaluierung von Kosten und Nutzen von Veränderungen in der Tomatenproduktion wurde entwickelt, mit dem Unternehmen Gewinne und deren Änderungen ermitteln können. Die Modellierung des Primingeffekts zeigte deutlich, dass nur eine geringe Verbesserung durch das Hitze-Priming bei Hitzestress geben war. Das online verfügbare tool *Optimal Priming* (<https://agtools.app/tomaten/>) ermöglicht es Tomatenlandwirten aber vor allem auch der weiteren Modellierungsforschung in landwirtschaftlichen Kontexten, die wirtschaftliche Leistungsfähigkeit zweier Tomatensorten unter Unsicherheiten zu bewerten.

Wissenschaftlicher und wirtschaftlicher Anschluss

Der Verlust der Priming-Erinnerung über die längere Zeit und auch die beobachteten Unterschiede in der Reaktion verschiedener Tomatensorten sind Fragestellungen, die Partner des Projektes weiter aufgreifen sollten. Momentan bestehen weitere Kooperationen im Projekt QCuK (BMEL) zur Klima-Resilienz von Zucchini zwischen Partner 1 (Forschungszentrum Jülich, IBG-4) und Partner 2 (Hochschule Geisenheim, Institut für Gemüsebau) und im Projekt FABALOUS (BMBF) zur abiotischen Stresstoleranz in Ackerbohnen zwischen Partner 1 und Partner 5 (Universität Bayreuth, Professur für Genetik der Nutzpflanzen).

7. Gegenüberstellung der ursprünglich geplanten zu den tatsächlich erreichten Zielen; Hinweise auf weiterführende Fragestellungen

Arbeitspaket 1: Priming von Tomaten-Jungpflanzen gegen abiotischen Stress (Forschungszentrum Jülich, IBG-4: Die Etablierung von Priming-Verfahren an Jungpflanzen in AP1.1 wurde erreicht. Wir konnten einen Salz-Primingeffekt in Tomaten zeigen, der eine Stärkung des Wachstums unter Salzstress noch 10 Tage nach einem Salz-Priming ermöglichte. Die in der Linie M82 beobachteten Ergebnisse ließen sich dabei auf die Produktionslinie Adeleza übertragen. Weitere Primingbehandlungen wie Kälte und Hitze zeigten keine deutlichen positiven Effekte auf das Pflanzenwachstum. Kältestresspriming zeigte eine gesteigerte Anreicherung pflanzlicher Sekundärmetabolite, die im Fall von in Folge angewandtem Kältestress auftrat aber nicht zu einem verbesserten Wachstum führten. Als Positivkontrolle war ein chemisches Priming mit Benzothiadiazol (BTH) geplant (**M1.1C**). Dieser Teil des Projektes wurde in Absprache mit dem Projektträger verworfen, da die Etablierung der BTH-Behandlung bei Partner 2 schon zu negativen Effekten führte.

Wir konnten die Stressantwort mittels einer Bild-basierten Technik zur Quantifizierung von Größe, Wachstum und Farbe der Pflanzen gut quantifizieren (**AP1.3**). Diese Messungen wurden begleitet durch eine **Quantifizierung der Stressantwort** der Reaktion des Sekundärmetabolismus (Totalphenolen, Anthozyane) und der Expression von ausgewählten Markergenen **in AP1.3, nach erfolgreicher Etablierung in AP1.2** (Etablierung RT qPCR und RNA-Extraktion).

In **AP1.4** wurde das etablierte **Priming von Jungpflanzen für Gewächshausstudien** mit einer Ausnahme erfolgreich durchgeführt, bei der wir wegen Defekten der Klimakammern kein Priming durchführen konnten. Jungpflanzen wurde für Partner 2 und 4 sowie für das Demonstrationsexperiment mit Salzstress geprimt. In einer **RNA-Seq Genexpressionsstudie (AP1.5)** konnten wir Gene und Prozesse identifizieren, die eine durch das Priming induzierte Salzstresstoleranz vermittelte. Das effektiv auf die Salztoleranz wirkende Salz-Priming konnte keine weiteren Toleranzen gegen Kältestress oder Hitzestress vermitteln, **AP1.6 Untersuchung von Toleranzen gegen weitere abiotische Stresse** wurde bearbeitet konnte aber keinen zusätzlichen Schutzeffekt des Salz-Primings zeigen. Hier könnten weitere Stresse untersucht werden, was im Rahmen der Projektlaufzeit wegen Klimakammerausfällen nicht möglich war.

Wir konnten eine Verbindung der Salzstresstoleranz mit der gesteigerten Expression im Gen NRT1 in **AP1.7** mit der epigenetischen Veränderung in dem Gen korrelieren (AP1.7). Eine Wirkung des Salz-Priming auf die Toleranz von Pflanzen die Tomaten in einem Demonstrationsexperiment unter Salzstress wuchsen konnte nicht nachgewiesen werden, es konnte dabei auch gezeigt werden, dass auch einige der ausgewählten Markergene die für die Vermittlung der Salztoleranz identifiziert wurden, im Demonstrationsexperiment nicht induziert wurden. Es ist anzunehmen, dass das Priming über längere Zeit seine Wirkung verloren hat. Solche Mechanismen zur Löschung eines Stress-Memories und auch der Nutzen davon für Pflanzen sind beschrieben (Crisp et al. 2016). Die Forschung an den dafür verantwortlichen Mechanismen wird helfen Priming weiterhin als eine Möglichkeit für einen nachhaltigen und nicht-chemischen Pflanzenschutz zu etablieren.

Arbeitspaket 2: Priming gegen biotischen Stress/Schadorganismen (Universität Bayreuth, Professur für Genetik der Nutzpflanzen): Die Ziele in **AP2.1 Etablierung von Stress-Priming-Verfahren an Jungpflanzen** wurden erreicht. So konnte in Kooperation mit **AP1** ein optimiertes Salz-Priming Verfahren etabliert werden sowie Proben für die Optimierung der epigenetischen Analysen in **AP4** zur Verfügung gestellt und erste Gen-Expressionsdaten gewonnen werden. Aus unten aufgeführten Gründen wurden weiteren Meilensteine im Bereich der Gen-Expressionsanalyse in **AP2.1** mit den entsprechenden Meilensteinen in **AP2.3** zusammengelegt und gemeinsam erreicht. Die aus **AP2.1** resultierende **Priming-Behandlung** inkludierte eine 5-tägige Exposition von auf Steinwolle angezogenen Tomatenjungpflanzen an 200 mM NaCl in Hoagland Medium und eine nachfolgende 10-tägige Erholungsphase ohne Salz. Eine erhöhte Krankheitsabwehr konnte bei Folgeinfektionen der Blätter von behandelten Jungpflanzen der Tomatensorte M82 mit den Pilz-Erregern *A. solani* und *A. alternata* festgestellt werden. Obwohl ursprünglich geplant war, weitere Versuche mit *A. solani* durchzuführen, wurde im weiteren Projektverlauf auf dem ähnlichen Pilz *A. alternata* zurückgegriffen, weil das genutzte *A. solani* Isolat trotz Re-Isolation aus Tomatenblättern an Virulenz verlor. Zusätzlich zum Salz-Priming wurden Kälte-Behandlungen als alternative oder zusätzliche Priming-Behandlungen getestet. Da diese Versuche ohne Erfolg blieben, wurde das Priming im weiteren Projektverlauf durchgehend mit dem oben zusammengefassten, optimierten Salz-Priming Verfahren ausgelöst.

In **AP2.2 Stressbehandlungen und folgende Untersuchung von erzeugten Resistenzen** wurden 2 von 3 Zielen erreicht. Der Meilenstein **M2.2A Etablierung der Infektion von Tomatenpflanzen mit Pepinomosavir** wurde bearbeitet, aber aus Zeit- und Verfügbarkeitsgründen nicht erreicht. Der geplante infektiöse Klon des Virus stand uns bisher nicht zur Verfügung, so dass auch weitere geplante Versuche im Rahmen von **AP2.2** nicht mit Pepinomosavir durchgeführt werden konnten. Alle weiteren Ziele in **AP2.2** wurden erreicht. Im Ergebnis ließ sich einen vom Salz-Priming hervorgerufenen Schutz, der wie oben beschrieben in Pflanzen der Tomatensorte M82 gegen den Erreger der Dürffleckenkrankheit, *A. alternata*, nachgewiesen werden konnte, bei zwei weiteren Krankheitserregern, dem Grauschimmelpilz *Botrytis cinerea* und dem Erreger der bakteriellen Fleckenkrankheit, *Pseudomonas syringae*, nicht nachweisen. Die im Rahmen von **AP2.2** getestete Anwendungssorte Adeleza reagierte vorwiegend (in 2 von 3 Versuchen) mit einer erhöhten Resistenz gegen *A. alternata* auf das Salz-Priming.

Alle oben beschriebenen Versuche wurden zusätzlich in der Tomatensorte Moneymaker durchgeführt. Die Ergebnisse zeigten, dass der vom Salz-Priming hervorgerufenen Schutz gegen *A. alternata* sortenabhängig in den Tomatensorte(n) M82 (und ggf. Adeleza), aber nicht in Moneymaker nachgewiesen werden konnte. Eine Schutzwirkung des Salz-Priming gegen *B. cinerea* oder *P. syringae* konnte ebenfalls nicht nachgewiesen werden. Gen-Expressionsdaten zeigten, dass die unterschiedlichen Infektionen in M82 jeweils Marker-Gene in unterschiedlichen Phytohormon-Signalkaskaden auslösten. Die mit dem Salz-Priming einhergehenden Gen-Expressionsänderungen in M82, wurden in der Tomatensorte Moneymaker nicht ausgelöst, was zu einer molekularen Erklärung der Sortenabhängigkeit des Schutzes beitragen könnte.

In **AP2.3 Korrelation von Genexpression mit epigenetischen Veränderungen** wurden 2 von 3 Zielen erreicht und ein weiteres Ziel teilweise erreicht. Für die Erreichung des **M2.3A Optimierung des Erntezeitpunktes für RNA-Sequenzierung von geprimten Genexpressionsänderungen** wurden mit Hilfe von RT-qPCR Daten für Marker-Gene von Phytohormon-Kaskaden in den Versuchsansätzen in **AP2.1** und **AP2.2** erhoben. Aus Zeitgründen wurde für die Wahl der

Zeitpunkte auf Erfahrungen aus anderen Projekten zurückgegriffen. **M2.1A** wurde damit teilweise erreicht und in Rücksprache mit dem Projektträger abgeschlossen. Auf Grund der fehlenden Schutzwirkung des Salz-Priming bei nachfolgenden Infektionen der Tomaten-Jungpflanzen mit *B. cinerea* oder *P. syringae* wurden die Versuche im Rahmen der Gen-Expressionsanalysen in **AP2.3** mit den Zielen in **AP2.1** zusammengelegt und auf das Salz-Priming in M82 mit nachfolgender Infektion der Blätter mit *A. alternata* beschränkt. Die RNA-Sequenzierungsdaten zeigten sowohl quantitative als auch qualitative Unterschiede in der Gen-Expression nach Infektion der Pflanzen in Abhängigkeit der Salz-Priming Behandlung. Mögliche diagnostische Marker wurden in diesem Bereich gesucht und eine Validierung der RNA-Sequenzierungsdaten damit erreicht. Allerdings stellte sich im Laufe der Versuche mit RT-qPCR heraus, dass die durch das Salz-Priming ausgelöste differenzielle Expression nach Infektion sich auch durch Unterschiede in der jeweiligen Ausprägung der durch *A. alternata* ausgelösten Gen-Expressionsänderungen ergab. Da dieser Unterschied damit viel mehr im quantitativen und nicht im qualitativen Bereich liegt, eignen sich die getestete Gene vermutlich weniger als diagnostische Marker für das Salz-Priming in der Anwendung.

Die Ziele in **AP2.4 Langzeitbeobachtung von geprimten und infizierten Pflanzen (Phänotypisierung)** wurden erreicht. Es konnten keine wesentlichen Unterschiede in Pflanzenwachstum (Höhe) und Blüten- bzw. Fruchtstellung (Anzahl der Blüten und Früchte) in Abhängigkeit des Salz-Priming festgestellt werden. Die Früchte der Salz-Priming Pflanzen zeigten sich anfälliger für *A. alternata* als die Kontrolle, so dass zum aktuellen Zeitpunkt geschlussfolgert werden muss, dass das Salz-Priming die Tomaten-Jungpflanzen im vegetativen Stadium und sortenabhängig zwar vor der Dürrefleckenkrankheit schützen kann, dafür aber mit einem möglichen *Trade-Off* im generativen Wachstumsstadium einhergeht.

Weiterführende Versuche sind geplant, um die Langzeiteffekte des Salz-Priming in weiteren Gewächshausversuche zu testen. Auch werden aktuell weitere DEGs aus den RNA-Sequenzierungsdaten mit Hilfe von RT-qPCR getestet, um Gene zu identifizieren, deren Expression mit einer geänderten Anfälligkeit von Tomatenpflanzen für *A. alternata* korreliert. Diese sollen als Grundlage für weiterführende Projekte dienen, mit dem Ziel die Resistenz von Tomaten gegen Krankheitserreger mit Hilfe von CRISPR-Cas Genom-Editierung zu erhöhen.

Arbeitspaket 3: Priming und Priming-Effekte während der Fruchtproduktion (Hochschule Geisenheim): Die Entwicklung eines mobilen Wagensystems zur Anwendung von Hitze- und UV-Applikation im Gewächshaus-Pflanzenbestand (**Meilenstein M3.1**) als Ziel in **AP3.1. Etablierung des technischen Aufbaus (Hitze/UV-Beleuchtung) im Gewächshaus** wurde mit Verzögerung erreicht. Im Jahr 2023 wurden die Beleuchtungswagen erstmalig im Versuch an der Sorte ‚M82‘ eingesetzt, um Effekte eines Hitze- und UV-B-Folgestresses nach Salz-Priming zu untersuchen. Aufgrund des verzögerten Einsatzes der Beleuchtungswagen wurde bei vorherigen Experimenten ein Schwerpunkt auf einen Salz-Folgestress statt Hitze- und UV-B Folgestress gelegt. Die ersten Messungen der UV-B Strahlung zeigten, dass diese zwar bei ‚M82‘ eine erhöhten Chlorophyllgehalt in den Blättern induzierte, allerdings zu gering ausfiel, um eine Stresswirkung bei den Tomatenpflanzen zu erzielen.

Der **Meilenstein M3.2** in **AP3.2 Etablierung und Optimierung der Stressbedingungen an Jungpflanzen** wurde planmäßig erreicht. Basierend auf einem Vorversuch (V1) und der Prüfung der Wirksamkeit unterschiedlich langer Anwendungen des Hitze-Priming (Experiment 2) sowie

der Ertragserfassung der Kultursorte ‘Adeleza’ (Experiment 1) wurden die Bedingungen des Priming- und Stressprotokolls erfolgreich etabliert. Dabei wurde BTH als Positivkontroll-Behandlung mit stimulierender Wirkung bei Hitze-Priming und Salz-Folgestress für zukünftige Experimente ausgeschlossen, da negative Effekte unter diesen abiotischen Stressbedingungen im gewachsenen Pflanzenbestand der Gewächshausversuche erfasst wurden. In **AP3.3 Entwicklung eines Messprotokolls für den Sensoreinsatz auf Blatt-/Fruchtebene** dienten diese Experimente zeitgleich der planmäßigen Etablierung nicht-invasiver Sensoren zur Erfassung physiologischer Stressreaktionen an Tomate: Es erwiesen sich fluoreszenzbasierte Indices, die stomatare Leitfähigkeit und Elektronentransportrate, sowie hyperspektralbasierte Vegetationsindizes (VIs) als geeignet (vgl. Kapitel 3.3.).

Die Anwendung von Hitze und UV-B in **AP3.4 Etablierung des Stressprotokolls (Hitze, UV) und Quantifizierung der Auswirkungen auf Ertrag und Qualitätsparameter** wurde planmäßig abgeschlossen. Dabei erfolgte die Ertrags- und Qualitätsbewertung des Hitze-Primings an der Sorte ‘Adeleza’ sowie des Salz-Primings an der Sorte ‘M82’ in den Experimenten 1, 3 und 4 (**M3.4**).

Aufgrund von Personalmangel musste das **AP3.5 Entwicklung des holistischen kausalen Modells zur Abschätzung kausaler Zusammenhänge** ertragsrelevanter Faktoren zeitlich verschoben werden. Der Meilenstein **M3.5A (Workshops durchgeführt und Daten für Modellierung vorbereitet)** konnte während der Produktionssaison nicht wie geplant in Form größerer Workshops mit vielen Teilnehmenden umgesetzt werden. Stattdessen wurde das Vorgehen angepasst: Es erfolgten gezielte Einzelbesuche bei Landwirtinnen und Landwirten sowie kleinere, regional begrenzte Workshops. Zusätzlich wurde eine interaktive Applikation *Optimal Priming* entwickelt, die eine angepasste Erfassung und Auswertung von Praxisdaten ermöglicht und somit langfristig einen höheren Nutzen für die Zielgruppe bietet. Der Meilenstein **M3.5B (Entwicklung eines holistischen ersten Modells zur Abschätzung kausaler Zusammenhänge relevanter Faktoren)** lief anschließend parallel zu dem Meilenstein **M3.5A**. Trotz Planabweichungen wurden zentrale Ziele erreicht. Die Applikation *Optimal Priming* ermöglicht praxisnahe Datennutzung und wirft neue Fragen zur Anwendbarkeit, Übertragbarkeit und Nutzerakzeptanz in landwirtschaftlichen Betrieben auf.

Zur Validierung der Ergebnisse aus den Vorjahren (**M3.6A**) in **AP3.6.A Validierung experimenteller Ergebnisse und Demonstrationsversuch (HGU, LWK NRW)** wurden Wiederholungsversuche sowie ein Demonstrationsversuch am Versuchszentrum Gartenbau der Landwirtschaftskammer NRW durchgeführt. Dafür wurden Salz-geprimte Pflanzen aus Jülich und Hitze-geprimte Pflanzen aus Geisenheim nach Straelen transferiert. Es zeigte sich, dass der Effekt des Primings mit größerem zeitlichem Abstand zwischen Primingstimulus und Folgestressbedingungen (Hitze und Salzstress) zu lang war, um eine effektive pflanzliche Abwehrreaktion zu erreichen.

Die Umsetzung des Meilensteins **M3.6B (Anpassung des Modellkonzepts hinsichtlich ökonomischer und ökologischer Praxisausrichtung) in AP3.6** verzögerte sich um etwa sechs Monate, da zunächst mit dem neu eingestellten Personal eine belastbare Datengrundlage erarbeitet werden musste. Anschließend wurde ein erstes ökonomisches Schätzungsmodell erfolgreich entwickelt und integriert. Der ökologische Aspekt konnte aufgrund begrenzter zeitlicher Ressourcen jedoch nicht mehr in ein praxistaugliches Modell überführt werden. Eine Literaturrecherche zu ökologischen Parametern wurde durchgeführt und bildet die Grundlage für eine mögliche Weiterentwicklung.

Arbeitspaket 4: Molekulare Bestimmung des Primings (Helmholtz Zentrum München, IFE):
Das Ziel in **AP4.1 (Etablierung von Salz-Priming-Verfahren an Jungpflanzen)** wurde erreicht.

Die Ziele in **AP4.2 (Etablierung der Epigenomik in Tomate/ Genomischen Untersuchungen zur Bestimmung epigenetischer Veränderungen durch Salz-Priming)** wurden weitestgehend erreicht. Lediglich die ChIP-seq Ergebnisse für H3K27me3 erfüllten nicht die üblichen Qualitätsstandards, da die DNA-Ausbeute offensichtlich nicht ausreichte für die zuverlässige Herstellung der DNA-Bibliotheken für die Hochdurchsatzsequenzierung. Durch Anpassung des Versuchsprotokolls (i.e. Erhöhung des Probenmaterials auf 3 g) konnten in die ChIP-seq Experimente in AP4.4 dennoch erfolgreich durchgeführt werden.

Die Identifizierung von Priming-Markergenen in **AP4.3 (Genexpressionsanalyse von Blattproben nach Salz-Priming (vor und nach Infektion))** wurde in Zusammenarbeit mit den Partner 1 und 5 erfolgreich abgeschlossen.

Die **genomischen Untersuchungen zur Bestimmung epigenetischer Veränderungen durch abiotisches Stress-Priming in AP4.4** wurden wie geplant abgeschlossen. Da sich sowohl die DNA-Methylom-Muster als auch die genomweiten Histonmodifikationsprofile zwischen den einzelnen Versuchen (i.e. initiale Etablierung mit Blattproben von Pflanzen, die auf Erde angezogen wurden, Proben nach Salz-Priming von Partner 1 und Proben nach Salz-Priming von Partner 5 stark unterschieden, konnten keine einheitlichen, Priming-spezifischen epigenetischen Muster identifiziert werden. Dies behinderte einerseits die Übertragung der molekularen Untersuchungen auf die Hybridsorte Adeleza (**AP4.5**) und erschwerte andererseits die **Identifizierung Priming-spezifischer epigenetischer Marker in AP4.6**. Trotzdem konnten nach erfolgreicher Transkriptom-Analyse geprimter Pflanzen vor und nach Pathogen-Infektion in Zusammenarbeit mit Partner 5 (M4.4) und den vorausgehenden Genexpressionsuntersuchungen mit Partner 1 einzelne Kandidaten-Loci für das Salz-Priming in M82, die sowohl Veränderungen in der Genexpression als auch in der Histonmodifikation und/oder DNA-Methylierung zeigten, bestimmt werden. Eine abschließende Validierung der Kandidaten-Loci konnte aus zeitlichen Gründen nicht durchgeführt werden.

Somit war es auch nicht möglich, das **Nachweisverfahren für differentielle DNA-Methylierung** durch den KEASP-Assay, welcher erfolgreich im Rahmen von **AP4.7** etabliert wurde (M4.7A), auf Tomaten zu übertragen und im Demonstrationsversuch einzusetzen (M4.7B).

Arbeitspaket 5 Technologie- und Wissenstransfer in die Praxis: In AP5 wurden die meisten Ziele erreicht (Vgl. Kapitel 10 des Berichtes), es stehen noch Publikationen der Ergebnisse in Fachjournalen aus (Vgl. Kapitel 10.1). Außerdem wurde zum Projektabschluss anders als geplant kein weiterer Flyer erstellt, da die Ergebnisse nicht so eindeutig und erfolgreich mit Relevanz für eine Praxisanwendung waren, dass eine kompakte und einfache Darstellung in einem Flyer sinnvoll wäre. AP5.4. wurde nicht durchgeführt, da wir in Absprache mit Mitgliedern des Praxisbeirates entschieden haben, dass die Ergebnisse des Projektes zwar interessant und wegberetend sind, aber nicht in der Praxis angewandt werden können.

Ein der Öffentlichkeit zur Verfügung stehendes Online-Tool ermöglicht Landwirtinnen, Landwirten und weiteren Interessengruppen einen Kapitalwertvergleich zwischen zwei Tomatensorten. Die webbasierte Applikation wird auf einem Server der Universität Bonn gehostet und nutzt eine von der Posit-Community gespendete Domain.

8. Zusammenfassung

Pflanzen können sich an zuvor erlittenen Stress „erinnern“ und später besser auf Stresse reagieren – ein Prozess, der als „Priming“ bezeichnet wird. Im Rahmen des Projektes HortiPrimed wurde untersucht, wie Tomatenjungpflanzen durch frühzeitige Exposition gegenüber bestimmten Arten von Stress ohne den Einsatz von Chemikalien stärker wachsen und künftigen Herausforderungen besser standhalten können. Das Vorhaben verfolgt das Ziel, ein Primingverfahren für den praktischen Einsatz im Gemüsebau zunächst an der viel angebauten Tomate zu etablieren.

Es zeigt sich, dass Salzstress-Priming in Tomatenjungpflanzen noch nach einer Erholungsphase von 10 Tagen nach dem initialen Primingstress positive Effekte auf die Toleranz gegen biotischen und abiotischen Stress hatte. Salz-Priming löste eine Priming-Reaktion aus, welche Tomatenjungpflanzen der Sorte M82 sowohl vor einer Blattinfektion mit *A. alternata* schützte als auch ein verbessertes Wachstum unter Salzstress ermöglichte. Diese wachstumssteigernde Wirkung des Salz-Primings zeigte sich auch bei der Hybridsorte Adeleza.

Diese Priming-Reaktionen gehen mit quantitativen Unterschieden der Genexpression einher. Es konnten Gene identifiziert werden, die die verbesserten Toleranzen/Resistenzen unterstützen könnten und für die Primingreaktion sowie für die Züchtung stresstoleranter Tomatensorten als Marker dienen können. Es wurde ein Defensin-Gen identifiziert, das stark responsiv durch das Priming und den Salzstress reguliert wurde, und grundlegend eine wichtige Rolle in der Salzstresstoleranz spielt, wie in andere Arbeiten beschrieben. Weiterhin wurde gezeigt, dass ein Dehydrin-Gen (TAS14) stark durch Salzstress induziert wurde und dass diese Steigerung durch das Priming weiter verstärkt wurde. Auch für TAS14 wurde in der Literatur bereits eine positive Wirkung auf eine Salztoleranz beschrieben. Epigenetische Untersuchungen zeigten, dass auch 10 Tage nach dem angewandten Salz-Primingstress starke Veränderungen in der DNA Methylierung und Histonmodifizierung (insbesondere H3K27me3) vorliegen. Es konnten epigenetisch markierte Gene identifiziert werden, die in geprimten Pflanzen stärker oder früher auf Stresse reagierten als in ungeprimten Pflanzen. Die Expression eines Nitrat-/Anionentransporter-Genes (NRT1-L) mit Priming induzierten Histonmarkierungen wurde in geprimten Pflanzen bei Salzstress stärker und früher ausgeprägt als in ungeprimten Pflanzen. Die Ergebnisse bestätigten, dass Salzstress zu mittelfristigen epigenetischen Veränderungen führt, welche als somatische Gedächtnis wirken und so über eine verbesserte Stressreaktion auf Ebene der Genregulation zu erhöhten Toleranzen und Resistenzen beitragen können. Eine PCR-basierte diagnostische Methode (KEASP-Assay) zur effizienten Überprüfung von DNA Methylierungs-Veränderungen konnte erfolgreich etabliert werden.

Eine wichtige Rolle bei der schützenden Wirkung von Priming durch Salzapplikation oder Hitzeanwendung bei nachfolgenden abiotischen Stressbedingungen konnte für den phenolischen Sekundärmetabolismus gezeigt werden: In geprimten Jungpflanzen wurde eine stärkere und schnellere Anreicherung unter Salzstress und auch eine frühere Induktion der zugehörigen Biosynthesegene gezeigt werden, was die schnellere Anreicherung erklärt. Ungeprimte Pflanzen wiesen unter Salzstress erst später eine Anreicherung dieser Gene auf, was die bekannte Wirkung des Primings bestätigt: Reaktionen treten bei geprimten Pflanzen stärker oder früher auf als bei ungeprimten Pflanzen. Auch bei einer längeren Zeitspanne zwischen Priming-Stress und Folgestress zeigte sich nach Hitze-Priming von Keimlingen eine leichte Erhöhung der Flavonoid- und Anthocyangehalte als Reaktion auf Salz- oder Hitzefolgestress. Dies

deutet darauf hin, dass der phenolische Sekundärstoffwechsel mit seiner schützenden Funktion ein wesentliches Ziel des Primings darstellt.

Hitze-Priming hat das Potential, den Tomatenanbau unter erschwerten Kulturbedingungen (Hitzewellen) und extremen Wachstumsbedingungen (wie hoher Salzbelastung des Wassers oder Bodens) zu unterstützen. Damit könnte global die nutzbare Anbaufläche vergrößert und ein hohes Produktivitätsniveau aufrechterhalten werden, um die Nahrungsmittelproduktion sowie Produktqualität zu sichern und zu gewährleisten. Allerdings ließ die Wirkung des Salzstress-Primings bei längerem zeitlichem Abstand zur Priming-Behandlung bis zum generativen Stadium nach.

Die angewandten Priming-Behandlungen zeigten unter Anbaubedingungen ohne Stresseinwirkung keine nachteiligen Auswirkungen auf Erträge, obwohl sich während der Kulturperiode zunächst Unterschiede in Wachstum und Entwicklung abzeichneten. Eine positive Auswirkung des Primings auf die Ertragsleistung und Fruchtqualität bei nachfolgendem Salz- oder Hitzestress konnte jedoch auch nicht nachgewiesen werden. Darüber hinaus zeigte sich sogar, dass Salz-Priming die Anfälligkeit der Früchte für eine *A. alternata* Infektion erhöhen kann; Früchte geprimter Pflanzen erwiesen sich als empfänglicher für diesen phytopathogenen Pilzbefall.

Eine Modellierung der beobachteten Effekte, unter Einbezug zentraler Parameter der Tomatenproduktion, zeigt einen leicht positiven Effekt des Hitze-Primings auf die Reaktion der Pflanzen bei einem Hitzefolgestress. Ein Modell zur Evaluierung von Kosten und Nutzen sowie möglicher Anpassungsstrategien in der Tomatenproduktion wurde entwickelt, mit dem Unternehmen potenzielle Gewinne und entscheidungsbedingte Änderungen der Gewinnmarge ermitteln können. Das online verfügbare tool Optimal Priming (<https://agtools.app/tomaten/>) ermöglicht es Tomatenlandwirten und vor allem auch der weiteren Modellierungsforschung in landwirtschaftlichen Kontexten, die wirtschaftliche Leistungsfähigkeit zweier Tomatensorten unter Berücksichtigungen von anbaubedingten Unsicherheiten zu bewerten.

Es lässt sich konstatieren, dass HortiPrimed das Verständnis von Priming als natürlichen Schutzmechanismus für Pflanzen erweitert hat. Das Projekt konnte demonstrieren, dass frühzeitige Stressbehandlungen in der Pflanzenwelt als eine Art "Impfung" fungieren können und dazu beitragen, zukünftige Herausforderungen besser zu bewältigen. Um eine anhaltende Anwendung mit Schutzwirkung für die Tomatenproduktion zu erreichen, sind weitere Forschungsmaßnahmen erforderlich. Dabei ist zudem die Durchführung von Forschungsaktivitäten hinsichtlich des Zurücksetzens oder Löschens von Stresserinnerungen erforderlich. Im Rahmen des Projekts wurden unterschiedliche Reaktionen auf Stress und Priming verschiedener Sorten beobachtet. Diese Reaktionen sind auch in Zukunft weiter zu untersuchen, um die Mechanismen einer Priming-Reaktivität zu verstehen.

9. Literaturverzeichnis

- Abe-Matsumoto L, Sampaio G, Bastos D (2020) Is Titration as Accurate as HPLC for Determination of Vitamin C in Supplements? —Titration versus HPLC for Vitamin C Analysis. *American Journal of Analytical Chemistry* 11 (7). doi:10.4236/ajac.2020.117021.
- AbuQamar S, Chai M-F, Luo H, Song F, Mengiste T (2008) Tomato Protein Kinase 1b Mediates Signaling of Plant Responses to Necrotrophic Fungi and Insect Herbivory. *The Plant Cell* 20 (7):1964-1983. doi:<https://doi.org/10.1105/tpc.108.059477>
- Adhikari P, Oh Y, Panthee DR (2017) Current Status of Early Blight Resistance in Tomato: An Update. *Int J Mol Sci* 18 (10). doi:<https://doi.org/10.3390/ijms18102019>
- Ainsworth EA, Gillespie KM (2007) Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin-Ciocalteu reagent. *Nat Protoc* 2 (4):1750-2799 (Electronic). doi:10.1038/nprot.2007.102.
- Akalin A, Kormaksson M, Li S, Garrett-Bakelman FE, Figueroa ME, Melnick A, Mason CE (2012) methylKit: a comprehensive R package for the analysis of genome-wide D. *Genome Biology* 13 (10):R87. doi:10.1186/gb-2012-13-10-r87
- Ali M, Sugimoto K, Ramadan A, Arimura G-i (2013) Memory of plant communications for priming anti-herbivore responses. *Scientific Reports* 3 (1):1872. doi:10.1038/srep01872
- Alonge M, Soyk S, Ramakrishnan S, Wang X, Goodwin S, Sedlazeck FJ, Lippman ZB, Schatz MC (2019) RaGOO: fast and accurate reference-guided scaffolding of draft genomes. *Genome Biology* 20 (1):224. doi:10.1186/s13059-019-1829-6
- Alvarez-Fernandez A, Bernal MJ, Fradejas I, Martín Ramírez A, Md Yusuf NA, Lanza M, Hisam S, Pérez de Ayala A, Rubio JM (2021) KASP: a genotyping method to rapid identification of resistance in *Plasmodium falciparum*. *Malaria Journal* 20 (1):16. doi:10.1186/s12936-020-03544-7
- Alzahrani O, Abouseadaa H, Abdelmoneim TK, Alshehri MA, El-Mogy M, El-Beltagi HS, Atia MAM (2021) Agronomical, physiological and molecular evaluation reveals superior salt-tolerance in bread wheat through salt-induced priming approach. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca* 49 (2):12310. doi:10.15835/nbha49212310
- Arvidsson S, Kwasniewski M, Riaño-Pachón DM, Mueller-Roeber B (2008) QuantPrime – a flexible tool for reliable high-throughput primer design for quantitative PCR. *BMC Bioinformatics* 9 (1):465. doi:10.1186/1471-2105-9-465
- Azami-Sardooei Z, Seifi HS, De Vleeschauwer D, Höfte M (2013) Benzothiadiazole (BTH)-induced resistance against *Botrytis cinerea* is inversely correlated with vegetative and generative growth in bean and cucumber, but not in tomato. *Australasian Plant Pathology* 42 (4):485-490. doi:10.1007/s13313-013-0207-1
- Beckers GJM, Conrath U (2007) Priming for stress resistance: from the lab to the field. *Current Opinion in Plant Biology* 10 (4):425-431. doi:<https://doi.org/10.1016/j.pbi.2007.06.002>
- Benhamou N, Bélanger RR (1998) Benzothiadiazole-Mediated Induced Resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* in Tomato. *Plant Physiol* 118
- Berger SL, Kouzarides T, Shiekhhattar R, Shilatifard A (2009) An operational definition of epigenetics. *Genes Dev* 23 (7):781-783. doi:10.1101/gad.1787609
- Bio-Rad-Laboratories CFX Maestro Software. <https://www.bio-rad.com/sites/default/files/webroot/web/pdf/lsr/literature/10000126764pdf>
- Bisbis M, Gruda N, Blanke M (2018) Adapting to climate change with greenhouse technology. *Acta Hort* 1227:107-114. doi:<https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2018.1227.13>
- BMEL (2013) Nationaler Aktionsplan Pflanzenschutz. <https://www.nap-pflanzenschutz.de/>
- BMEL (2024) Bio-Strategie 2030. doi:https://www.bmel.de/SharedDocs/Downloads/DE/Broschueren/bio-strategie-2030.pdf?__blob=publicationFile&v=10

- Bolger A, Scossa F, Bolger ME, Lanz C, Maumus F, Tohge T, Quesneville H, Alseekh S, Sørensen I, Lichtenstein G, Fich EA, Conte M, Keller H, Schneeberger K, Schwacke R, Ofner I, Vrebalov J, Xu Y, Osorio S, Aflitos SA, Schijlen E, Jiménez-Gómez JM, Ryngajllo M, Kimura S, Kumar R, Koenig D, Headland LR, Maloof JN, Sinha N, van Ham RCHJ, Lankhorst RK, Mao L, Vogel A, Arsova B, Panstruga R, Fei Z, Rose JKC, Zamir D, Carrari F, Giovannoni JJ, Weigel D, Usadel B, Fernie AR (2014a) The genome of the stress-tolerant wild tomato species *Solanum pennellii*. *Nature Genetics* 46 (9):1034-1038. doi:10.1038/ng.3046
- Bolger AM, Lohse M, Usadel B (2014b) Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 30 (15):2114-2120. doi:10.1093/bioinformatics/btu170
- Bolger M, Schwacke R, Usadel B (2021) MapManMapMan Visualization of RNA-Seq Data Using Mercator4Mercator4 Functional Annotations. In: Dobnik D, Gruden K, Ramšak Ž, Coll A (eds) *Solanum tuberosum: Methods and Protocols*. Springer US, New York, NY, pp 195-212. doi:10.1007/978-1-0716-1609-3_9
- Boorboori MR, and Li J (2025) The effect of salinity stress on tomato defense mechanisms and exogenous application of salicylic acid, abscisic acid, and melatonin to reduce salinity stress. *Soil Science and Plant Nutrition* 71 (1):93-110. doi:10.1080/00380768.2024.2405834
- Borromeo I, Del Gallo M, Forni C (2025) Salt Stress and Tomato Resilience: From Somatic to Intergenerational Priming Memory. *Horticulturae* 11 (3):236
- Botella MÁ, Hernández V, Mestre T, Hellín P, García-Legaz MF, Rivero RM, Martínez V, Fenoll J, Flores P (2021) Bioactive Compounds of Tomato Fruit in Response to Salinity, Heat and Their Combination. *Agriculture* 11 (6):534. doi:10.3390/agriculture11060534
- Boyer JS (1982) Plant Productivity and Environment. *Science* 218 (4571):443-448. doi:doi:10.1126/science.218.4571.443
- Brambilla A, Sommer A, Ghirardo A, Wenig M, Knappe C, Weber B, Amesmaier M, Lenk M, Schnitzler JP, Vlot AC (2022) Immunity-associated volatile emissions of β -ionone and nonanal propagate defence responses in neighbouring barley plants. *J Exp Bot* 73 (2):615-630. doi:10.1093/jxb/erab520
- Brown JKM, Rant JC (2013) Fitness costs and trade-offs of disease resistance and their consequences for breeding arable crops. *Plant Pathology* 62 (S1):83-95. doi:<https://doi.org/10.1111/ppa.12163>
- Bruhl CA, Schmidt T, Pieper S, Alscher A (2013) Terrestrial pesticide exposure of amphibians: an underestimated cause of global decline? *Sci Rep* 3:1135. doi:10.1038/srep01135
- Bundesanzeiger (2019) Innovationen nicht-chemischer Pflanzenschutzverfahren im Gartenbau. BAnz AT 09082019 B4
- BVL (1997) Untersuchung von Lebensmitteln - Bestimmung der titrierbaren Säure von Frucht- und Gemüsesäften (Übernahme der gleichlautenden DIN EN 12147). Technische Regel
- Ceccarelli S, Grando S (2006) Decentralized-participatory plant breeding: an example of demand driven research. *Euphytica* 155 (3):349-360. doi:10.1007/s10681-006-9336-8
- Cerovic ZG, Masdoumier G, Ghazlen NB, Latouche G (2012) A new optical leaf-clip meter for simultaneous non-destructive assessment of leaf chlorophyll and epidermal flavonoids. *Physiol Plant* 146 (3):251-260. doi:10.1111/j.1399-3054.2012.01639.x
- Chang W, Cheng J, Allaire J, Sievert C, Schloerke B, Xie Y, Allen J, McPherson J, Dipert A, Borges B (2024) shiny: Web Application Framework for R (R package version 1.9.1). doi:<https://CRAN.R-project.org/package=shiny>
- Chen CZ, Lv XF, Li JY, Yi HY, Gong JM (2012) Arabidopsis NRT1.5 is another essential component in the regulation of nitrate reallocation and stress tolerance. *Plant Physiol* 159 (4):1582-1590. doi:10.1104/pp.112.199257
- Chong I-G, Jun C-H (2005) Performance of some variable selection methods when multicollinearity is present. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 78 (1):103-112. doi:<https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2004.12.011>
- Conrath U (2011) Molecular aspects of defence priming. *Trends Plant Sci* 16 (10):524-531. doi:10.1016/j.tplants.2011.06.004

- Conrath U, Beckers GJ, Langenbach CJ, Jaskiewicz MR (2015) Priming for enhanced defense. *Annu Rev Phytopathol* 53:97-119. doi:10.1146/annurev-phyto-080614-120132
- Crisp PA, Ganguly D, Eichten SR, Borevitz JO, Pogson BJ (2016) Reconsidering plant memory: Intersections between stress recovery, RNA turnover, and epigenetics. *Science Advances* 2 (2):e1501340. doi:doi:10.1126/sciadv.1501340
- de Mendiburu F, de Mendiburu MF (2023) agricolae: Statistical Procedures for Agricultural. *Research R package version 1* (3):1143-1149
- Delgado-Vargas VA, Ayala-Garay OJ, Arévalo-Galarza MdL, Gautier H (2023) Increased Temperature Affects Tomato Fruit Physicochemical Traits at Harvest Depending on Fruit Developmental Stage and Genotype. *Horticulturae* 9 (2):212
- Dipta B, Sood S, Mangal V, Bhardwaj V, Thakur AK, Kumar V, Singh B (2024) KASP: a high-throughput genotyping system and its applications in major crop plants for biotic and abiotic stress tolerance. *Molecular Biology Reports* 51 (1):508. doi:10.1007/s11033-024-09455-z
- do Amaral MN, Arge LWP, Auler PA, Rossatto T, Milech C, Magalhães AMd, Braga EJB (2020) Long-term transcriptional memory in rice plants submitted to salt shock. *Planta* 251 (6):111. doi:10.1007/s00425-020-03397-z
- Domingo G, Locato V, Cimini S, Ciceri L, Marsoni M, De Gara L, Bracale M, Vannini C (2024) A comprehensive characterization and expression profiling of defensin family peptides in *Arabidopsis thaliana* with a focus on their abiotic stress-specific transcriptional modulation. *Current Plant Biology* 39:100376. doi:<https://doi.org/10.1016/j.cpb.2024.100376>
- Dörr OS, Zimmermann BF, Kögler S, Mibus H (2019) Influence of leaf temperature and blue light on the accumulation of rosmarinic acid and other phenolic compounds in *Plectranthus scutellarioides* (L.). *Environmental and Experimental Botany* 167:103830. doi:<https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2019.103830>
- Downen RH, Pelizzola M, Schmitz RJ, Lister R, Downen JM, Nery JR, Dixon JE, Ecker JR (2012) Widespread dynamic DNA methylation in response to biotic stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109 (32):E2183-2191. doi:10.1073/pnas.1209329109
- Driedonks N (2018) From flower to fruit in the heat - Reproductive thermotolerance in tomato and its wild relatives. Dissertation, Radboud University Nijmegen,
- Eghdami A, Sadeghi F (2010) Determination of Total Phenolic and Flavonoids Contents in Methanolic and Aqueous Extract of *Achillea Millefolium*. *Organic Chemistry Journal* 1 (2):81
- Eshed Y, Zamir D (1995) An introgression line population of *Lycopersicon pennellii* in the cultivated tomato enables the identification and fine mapping of yield-associated QTL. *Genetics* 141 (3):1147-1162. doi:10.1093/genetics/141.3.1147
- Espley RV, Jaakola L (2023) The role of environmental stress in fruit pigmentation. *Plant, Cell & Environment* 46 (12):3663-3679. doi:<https://doi.org/10.1111/pce.14684>
- Falcone Ferreyra ML, Rius SP, Casati P (2012) Flavonoids: biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications. *Front Plant Sci* 3:222. doi:10.3389/fpls.2012.00222
- Fan Y, Ma C, Huang Z, Abid M, Jiang S, Dai T, Zhang W, Ma S, Jiang D, Han X (2018) Heat Priming During Early Reproductive Stages Enhances Thermo-Tolerance to Post-anthesis Heat Stress via Improving Photosynthesis and Plant Productivity in Winter Wheat (*Triticum aestivum* L.). *Front Plant Sci* 9:805. doi:10.3389/fpls.2018.00805
- Feller C, Bleiholder H, Buhr L, Hack H, Heß M, Klose R, Meier U, Stauß R, Boom Tvd, Weber E (1995) Phänologische Entwicklungsstadien von GemüsepflanzenII. Fruchtgemüse und Hülsenfrüchte: Codierung und Beschreibung nach der erweiterten BBCH-Skala - mit Abbildungen. Heft 9 47 (9):217-232
- Feng XJ, Li JR, Qi SL, Lin QF, Jin JB, Hua XJ (2016) Light affects salt stress-induced transcriptional memory of P5CS1 in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113 (51):E8335-E8343. doi:doi:10.1073/pnas.1610670114

- Foolad MR (2007) Current Status Of Breeding Tomatoes For Salt And Drought Tolerance. In: Jenks MA, Hasegawa PM, Jain SM (eds) *Advances in Molecular Breeding Toward Drought and Salt Tolerant Crops*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp 669–700. doi:10.1007/978-1-4020-5578-2_27
- Francini A, Sebastiani L (2019) Abiotic Stress Effects on Performance of Horticultural Crops. *Horticulturae* 5 (4). doi:10.3390/horticulturae5040067
- Geiger F, Bengtsson J, Berendse F, Weisser WW, Emmerson M, Morales MB, Ceryngier P, Liira J, Tschardt T, Winqvist C, Eggers S, Bommarco R, Pärt T, Bretagnolle V, Plantegenest M, Clement LW, Dennis C, Palmer C, Oñate JJ, Guerrero I, Hawro V, Aavik T, Thies C, Flohre A, Hänke S, Fischer C, Goedhart PW, Inchausti P (2010) Persistent negative effects of pesticides on biodiversity and biological control potential on European farmland. *Basic and Applied Ecology* 11 (2):97–105. doi:<https://doi.org/10.1016/j.baae.2009.12.001>
- Genzel F, Dicke MD, Junker-Frohn LV, Neuwohner A, Thiele B, Putz A, Usadel B, Wormit A, Wiese-Klinkenberg A (2021) Impact of Moderate Cold and Salt Stress on the Accumulation of Antioxidant Flavonoids in the Leaves of Two Capsicum Cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 69 (23):6431–6443. doi:10.1021/acs.jafc.1c00908
- Gerszberg A, Hnatuszko-Konka K (2017) Tomato tolerance to abiotic stress: a review of most often engineered target sequences. *Plant Growth Regulation* 83 (2):175–198. doi:10.1007/s10725-017-0251-x
- Gomez L, Bancel D, Rubio E, Vercambre G (2007) The microplate reader: an efficient tool for the separate enzymatic analysis of sugars in plant tissues—validation of a micro-method. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 87 (10):1893–1905. doi:<https://doi.org/10.1002/jsfa.2924>
- Groth M, Moissiard G, Wirtz M, Wang H, Garcia-Salinas C, Ramos-Parra PA, Bischof S, Feng S, Cokus SJ, John A, Smith DC, Zhai J, Hale CJ, Long JA, Hell R, Díaz de la Garza RI, Jacobsen SE (2016) MTHFD1 controls DNA methylation in Arabidopsis. *Nature Communications* 7 (1):11640. doi:10.1038/ncomms11640
- Gruda N, Bisbis M, Tanny J (2019) Influence of climate change on protected cultivation: Impacts and sustainable adaptation strategies - A review. *Journal of Cleaner Production* 225:481–495. doi:10.1016/j.jclepro.2019.03.210
- Gruda N, Tanny J (2014) Protected Crops. In: Dixon GR, Aldous DE (eds) *Horticulture: Plants for People and Places, Volume 1: Production Horticulture*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp 327–405. doi:10.1007/978-94-017-8578-5_10
- Hance T, van Baaren J, Vernon P, Boivin G (2007) Impact of Extreme Temperatures on Parasitoids in a Climate Change Perspective. *Annual Review of Entomology* 52 (Volume 52, 2007):107–126. doi:<https://doi.org/10.1146/annurev.ento.52.110405.091333>
- Hanssen IM, Thomma BP (2010) Pepino mosaic virus: a successful pathogen that rapidly evolved from emerging to endemic in tomato crops. *Mol Plant Pathol* 11 (2):179–189. doi:10.1111/j.1364-3703.2009.00600.x
- Hilker M, Schwachtje J, Baier M, Balazadeh S, Baurle I, Geiselhardt S, Hinch DK, Kunze R, Mueller-Roeber B, Rillig MC, Rolff J, Romeis T, Schmulling T, Steppuhn A, van Dongen J, Whitcomb SJ, Wurst S, Zuther E, Kopka J (2016) Priming and memory of stress responses in organisms lacking a nervous system. *Biol Rev Camb Philos Soc* 91 (4):1118–1133. doi:10.1111/brv.12215
- Hoagland DR, Arnon DI (1950) The Water-Culture Method for Growing Plants without Soil. *California Agricultural Experiment Station Circular*-347
- Holst F, Bolger A, Günther C, Maß J, Triesch S, Kindel F, Kiel N, Saadat N, Ebenhöf O, Usadel B, Schwacke R, Bolger M, Weber APM, Denton AK (2023) Helixer—de novo Prediction of Primary Eukaryotic Gene Models Combining Deep Learning and a Hidden Markov Model. *bioRxiv*:2023.2002.2006.527280. doi:10.1101/2023.02.06.527280
- Hubbard DW (2014) *How to measure anything: finding the value of “intangibles” in business*, 3rd edn. Wiley, Hoboken, N.J.

- Huot B, Yao J, Montgomery BL, He SY (2014) Growth-defense tradeoffs in plants: a balancing act to optimize fitness. *Mol Plant* 7 (8):1267-1287. doi:10.1093/mp/ssu049
- IPPC (2018) Special Report Global Warming of 1.5 °C. www.ipcc.ch
- Islam F, Yasmeen T, Ali S, Ali B, Farooq MA, Gill RA (2015) Priming-induced antioxidative responses in two wheat cultivars under saline stress. *Acta Physiologiae Plantarum* 37 (8):153. doi:10.1007/s11738-015-1897-5
- Iwasaki M, Paszkowski J (2014) Epigenetic memory in plants. *EMBO J* 33 (18):1987-1998. doi:10.15252/embj.201488883
- Jahan MS, Shu S, Wang Y, Chen Z, He M, Tao M, Sun J, Guo S (2019) Melatonin alleviates heat-induced damage of tomato seedlings by balancing redox homeostasis and modulating polyamine and nitric oxide biosynthesis. *BMC Plant Biology* 19 (1):414. doi:10.1186/s12870-019-1992-7
- Jaskiewicz M, Conrath U, Peterhansel C (2011) Chromatin modification acts as a memory for systemic acquired resistance in the plant stress response. *EMBO Rep* 12 (1):50-55. doi:10.1038/embor.2010.186
- Javanmardi J, Majid R, and Nasirzadeh M (2014) Responses of Tomato and Pepper Transplants to High-Temperature Conditioning. *International Journal of Vegetable Science* 20 (4):374-391. doi:10.1080/19315260.2013.816209
- Jayakumar M, Eyini M, Selvinthangadurai P, Lingakumar K, Premkumar A, Kulandaivelu G (1999) Changes in Pigment Composition and Photosynthetic Activity of Aquatic Fern (*Azolla Microphylla* Kaulf.) Exposed to Low Doses of UV-C (254 nm) Radiation. *Photosynthetica*, vol 37.
- Junker-Frohn LV, Luck M, Schmittgen S, Wensing J, Carraresi L, Thiele B, Groher T, Reimer JJ, Broring S, Noga G, Jupke A, Schurr U, Usadel B, Wiese-Klinkenberg A, Wormit A (2019) Tomato's Green Gold: Bioeconomy Potential of Residual Tomato Leaf Biomass as a Novel Source for the Secondary Metabolite Rutin. *ACS Omega* 4 (21):19071-19080. doi:10.1021/acsomega.9b01462
- Kassambara A (2020) ggpubr: “ggplot2” Based Publication Ready Plots. R Package Version 0.4.0. . <https://CRAN.R-project.org/package=ggpubr>
- Khan A, Mathelier A (2017) Intervene: a tool for intersection and visualization of multiple gene or genomic region sets. *BMC Bioinformatics* 18 (1):287. doi:10.1186/s12859-017-1708-7
- Kok EJ, Glandorf DCM, Prins TW, Visser RGF (2019) Food and environmental safety assessment of new plant varieties after the European Court decision: Process-triggered or product-based? *Trends in Food Science & Technology* 88:24-32. doi:10.1016/j.tifs.2019.03.007
- Kolde R (2019) pheatmap: Pretty Heatmaps Implementation of heatmaps that offers more control over dimensions and appearance. doi: 10.32614/CRAN.package.pheatmap
- Kopton J (2024) evpi: EVPI (Version 1.0-1) [Computer software]. GitHub. <https://github.com/johanneskopton/evpi>.
- Körner T, Gierholz R, Zinkernagel J, Röhlen-Schmittgen S (2024a) Heat-Induced Cross-Tolerance to Salinity Due to Thermopriming in Tomato. *Metabolites* 14 (4):213. doi:10.3390/metabo14040213
- Körner T, Zinkernagel J, Röhlen-Schmittgen S (2024b) Induction of Time-Dependent Tolerance through Thermopriming in Tomatoes. *Sustainability* 16 (3):1163. doi:10.3390/su16031163
- Körner T, Zinkernagel J, Röhlen-Schmittgen S (2024c) Thermopriming Induces Time-Limited Tolerance to Salt Stress. *International Journal of Molecular Sciences* 25 (14):7698. doi:10.3390/ijms25147698
- Körner T, Zinkernagel J, Röhlen-Schmittgen S (2025) Plant Growth and Metabolic Responses of Tomato Varieties to Salinity Stress After Thermopriming. *Stresses* 5 (2):27
- Krishna R, Karkute SG, Ansari WA, Jaiswal DK, Verma JP, Singh M (2019) Transgenic tomatoes for abiotic stress tolerance: status and way ahead. *3 Biotech* 9:1-14
- Krueger F, Andrews SR (2011) Bismark: a flexible aligner and methylation caller for Bisulfite-Seq applications. *Bioinformatics* 27 (11):1571-1572. doi:10.1093/bioinformatics/btr167

- Kumar K, Debnath P, Singh S, Kumar N (2023) An Overview of Plant Phenolics and Their Involvement in Abiotic Stress Tolerance. *Stresses* 3 (3):570-585
- Laflamme B, Middleton M, Lo T, Desveaux D, Guttman DS (2016) Image-Based Quantification of Plant Immunity and Disease. *Mol Plant Microbe Interact* 29 (12):919-924. doi:10.1094/mpmi-07-16-0129-ta
- Lämke J, Bäurle I (2017) Epigenetic and chromatin-based mechanisms in environmental stress adaptation and stress memory in plants. *Genome Biol* 18 (1):124. doi:10.1186/s13059-017-1263-6
- Lämke J, Brzezinka K, Altmann S, Bäurle I (2016) A hit-and-run heat shock factor governs sustained histone methylation and transcriptional stress memory. *EMBO J* 35 (2):162-175. doi:10.15252/embj.201592593
- León-Chan RG, López-Meyer M, Osuna-Enciso T, Sañudo-Barajas JA, Heredia JB, León-Félix J (2017) Low temperature and ultraviolet-B radiation affect chlorophyll content and induce the accumulation of UV-B-absorbing and antioxidant compounds in bellpepper (*Capsicum annuum*) plants. *Environ Exp Bot* 139:143–151
- Li N, Euring D, Cha JY, Lin Z, Lu M, Huang L-J, Kim WY (2021a) Plant Hormone-Mediated Regulation of Heat Tolerance in Response to Global Climate Change. *Frontiers in Plant Science* 11:627969. doi:10.3389/fpls.2020.627969
- Li X, Sun J, Chen Z, Jiang J, Jackson A (2021b) Characterization of carotenoids and phenolics during fruit ripening of Chinese raspberry (*Rubus chingii* Hu). *RSC Adv* 11 (18):10804-10813. doi:10.1039/d0ra10373j
- Li X, Topbjerg HB, Jiang D, Liu F (2015) Drought priming at vegetative stage improves the antioxidant capacity and photosynthesis performance of wheat exposed to a short-term low temperature stress at jointing stage. *Plant and Soil* 393 (1-2):307-318. doi:10.1007/s11104-015-2499-0
- Lichtenthaler HK, Buschmann C (2001) Chlorophylls and Carotenoids: Measurement and Characterization by UV-VIS Spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry* 1 (1):F4.3.1-F4.3.8. doi:<https://doi.org/10.1002/0471142913.faf0403s01>
- Lindermayr C, Rudolf EE, Durner J, Groth M (2020) Interactions between metabolism and chromatin in plant models. *Molecular Metabolism* 38:100951. doi:<https://doi.org/10.1016/j.molmet.2020.01.015>
- Ling Y, Serrano N, Gao G, Atia M, Mokhtar M, Woo YH, Bazin J, Veluchamy A, Benhamed M, Crespi M, Gehring C, Reddy ASN, Mahfouz MM (2018) Thermoprimering triggers splicing memory in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany* 69 (10):2659-2675. doi:10.1093/jxb/ery062
- Liu W, Duttke SH, Hetzel J, Groth M, Feng S, Gallego-Bartolome J, Zhong Z, Kuo HY, Wang Z, Zhai J, Chory J, Jacobsen SE (2018) RNA-directed DNA methylation involves co-transcriptional small-RNA-guided slicing of polymerase V transcripts in Arabidopsis. *Nat Plants* 4 (3):181-188. doi:10.1038/s41477-017-0100-y
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25 (4):402-408. doi:10.1006/meth.2001.1262
- Løvdaal T, Lillo C (2009) Reference gene selection for quantitative real-time PCR normalization in tomato subjected to nitrogen, cold, and light stress. *Analytical Biochemistry* 387 (2):238-242. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ab.2009.01.024>
- Love MI, Huber W, Anders S (2014) Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology* 15 (12):550. doi:10.1186/s13059-014-0550-8
- Ludwig-Ohm S, Straeter C, Dirksmeyer W, Geyer M, Homeister H, Lampe I, Rath T, Schmieder M, Ziegler A (2017) BMEL-Entscheidungshilfsvorhaben „Forschungsstrategie für Innovationen im Gartenbau - HortInnova“ HortInnova-Forschungsstrategie Abschlussbericht.

- Luedeling E, Gassner A (2012) Partial Least Squares Regression for analyzing walnut phenology in California. *Agricultural and Forest Meteorology* 158-159:43-52. doi:<https://doi.org/10.1016/j.agrformet.2011.10.020>
- Luedeling E, Goehring L, Schiffers K, Whitney C, Fernandez E (2024) decisionSupport: Quantitative Support of Decision Making under Uncertainty (Version 1.114) [Computer software]. Comprehensive R Archive Network (CRAN). doi:<https://CRAN.R-project.org/package=decisionSupport>
- Luna E, Bruce TJ, Roberts MR, Flors V, Ton J (2012) Next-generation systemic acquired resistance. *Plant Physiol* 158 (2):844-853. doi:10.1104/pp.111.187468
- Mancinelli AL (1990) Interaction between Light Quality and Light Quantity in the Photoregulation of Anthocyanin Production. *Plant Physiol* 92 (4):1191-1195. doi:10.1104/pp.92.4.1191
- Martinez-Ferri E, Moreno-Ortega G, van den Berg N, Pliego C (2019) Mild water stress-induced priming enhance tolerance to Rosellinia necatrix in susceptible avocado rootstocks. *BMC Plant Biol* 19 (1):458. doi:10.1186/s12870-019-2016-3
- Martinez-Medina A, Flors V, Heil M, Mauch-Mani B, Pieterse CMJ, Pozo MJ, Ton J, van Dam NM, Conrath U (2016) Recognizing Plant Defense Priming. *Trends Plant Sci* 21 (10):818-822. doi:10.1016/j.tplants.2016.07.009
- Massaretto IL, Albaladejo I, Purgatto E, Flores FB, Plasencia F, Egea-Fernández JM, Bolarin MC, Egea I (2018) Recovering Tomato Landraces to Simultaneously Improve Fruit Yield and Nutritional Quality Against Salt Stress. *Frontiers in Plant Science* 9:1778. doi:10.3389/fpls.2018.01778
- Mauch-Mani B, Baccelli I, Luna E, Flors V (2017) Defense Priming: An Adaptive Part of Induced Resistance. *Annu Rev Plant Biol* 68:485-512. doi:10.1146/annurev-arplant-042916-041132
- Menda N, Semel Y, Peled D, Eshed Y, Zamir D (2004) In silico screening of a saturated mutation library of tomato. *Plant J* 38 (5):861-872. doi:10.1111/j.1365-313X.2004.02088.x
- Meng L, Feldman L (2010) A rapid TRIzol-based two-step method for DNA-free RNA extraction from Arabidopsis siliques and dry seeds. *Biotechnology Journal* 5 (2):183-186. doi:<https://doi.org/10.1002/biot.200900211>
- Molinari S, Baser N (2010) Induction of resistance to root-knot nematodes by SAR elicitors in tomato. *Crop Protection* 29 (11):1354-1362. doi:10.1016/j.cropro.2010.07.012
- Muñoz-Mayor A, Pineda B, Garcia-Abellán JO, Antón T, Garcia-Sogo B, Sanchez-Bel P, Flores FB, Atarés A, Angosto T, Pintor-Toro JA, Moreno V, Bolarin MC (2012) Overexpression of dehydrin tas14 gene improves the osmotic stress imposed by drought and salinity in tomato. *J Plant Physiol* 169 (5):459-468. doi:10.1016/j.jplph.2011.11.018
- Murshed R, Lopez-Lauri F, Sallanon H (2014) Effect of salt stress on tomato fruit antioxidant systems depends on fruit development stage. *Physiology and Molecular Biology of Plants* 20 (1):15-29. doi:10.1007/s12298-013-0209-z
- Nasrallah AK, Atia MAM, Abd El-Maksoud RM, Kord MA, Fouad AS (2022) Salt Priming as a Smart Approach to Mitigate Salt Stress in Faba Bean (*Vicia faba* L.). *Plants* 11 (12):1610
- Neff M, Chory J (1998) Genetic interactions between phytochrome A, phytochrome B, and cryptochrome during Arabidopsis development. *Plant Physiology*, vol 118.
- Nicolopoulou-Stamati P, Maipas S, Kotampasi C, Stamatis P, Hens L (2016) Chemical Pesticides and Human Health: The Urgent Need for a New Concept in Agriculture. *Front Public Health* 4 (148). doi:10.3389/fpubh.2016.00148
- OECD (2010) OECD-SCHEMA FÜR OBST UND GEMÜSE Leitfaden zu objektiven Testmethoden zur Bestimmung der Qualität von Obst und Gemüse sowie Trocken- und getrockneten Erzeugnissen. doi:<https://www.ble.de/DE/Themen/Ernaehrung-Lebensmittel/Vermarktungsnormen/Obst-Gemuese/Vermarktungsnormen-Hilfen-zur-Anwendung/OECD-Leitfaden.html>
- Olas JJ, Apelt F, Annunziata MG, John S, Richard SI, Gupta S, Kragler F, Balazadeh S, Mueller-Roeber B (2021) Primary carbohydrate metabolism genes participate in heat-stress

- memory at the shoot apical meristem of *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant* 14 (9):1508-1524. doi:10.1016/j.molp.2021.05.024
- Olías R, Eljakaoui Z, Pardo JM, Belver A (2009) The Na(+)/H(+) exchanger SOS1 controls extrusion and distribution of Na(+) in tomato plants under salinity conditions. *Plant Signal Behav* 4 (10):973-976. doi:10.4161/psb.4.10.9679
- Oliveros J (2007) VENNY. An interactive tool for comparing lists with Venn Diagrams. . <http://bioinfogpcnbcscsices/tools/venny/indexhtml>. doi:<https://cir.nii.ac.jp/crid/157169859921467392>
- Ortigosa A, Gimenez-Ibanez S, Leonhardt N, Solano R (2019) Design of a bacterial speck resistant tomato by CRISPR/Cas9-mediated editing of SUA22. *Plant Biotechnol J* 17 (3):665-673. doi:10.1111/pbi.13006
- Park D-Y, Shim Y, Gi E, Lee B-D, An G, Kang K, Paek N-C (2018) The MYB-related transcription factor RADIALIS-LIKE3 (OsRL3) functions in ABA-induced leaf senescence and salt sensitivity in rice. *Environmental and Experimental Botany* 156:86-95. doi:<https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2018.08.033>
- Patel H, Espinosa-Carrasco J, Wang C, Ewels P, bot n-c, Silva TC, Peltzer A, Langer B, Guinchard S, Garcia MU, Behrens D, Hörtenhuber M, Talbot A, Rokicki K, Syme R, Rotholandus, Pérez SR, Haglund S, Möller S, Kretschmar WWW, Menden K (2024) nf-core/chipseq: nf-core/chipseq v2.1.0 - Platinum Willow Sparrow. 2.1.0 edn. Zenodo,
- Patro R, Duggal G, Love MI, Irizarry RA, Kingsford C (2017) Salmon provides fast and bias-aware quantification of transcript expression. *Nature Methods* 14 (4):417-419. doi:10.1038/nmeth.4197
- Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L (2002) Relative Expression Software Tool (REST©) for group wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research* 30 (9)
- Pratx L, Crawford T, Bäurle I (2024) Mechanisms of heat stress-induced transcriptional memory. *Current Opinion in Plant Biology* 81:102590. doi:<https://doi.org/10.1016/j.pbi.2024.102590>
- R-Development-Core-Team (2020) R: A language and environment for statistical computing. . In: R Foundation for Statistical Computing, Vienna.
- Raj AB, Raj SK (2019) Seed priming: An approach towards agricultural sustainability. *Journal of Applied and Natural Science* 11 (1):227-234. doi:10.31018/jans.v11i1.2010
- Ramírez F, Ryan DP, Grüning B, Bhardwaj V, Kilpert F, Richter AS, Heyne S, Dündar F, Manke T (2016) deepTools2: a next generation web server for deep-sequencing data analysis. *Nucleic Acids Research* 44 (W1):W160-W165. doi:10.1093/nar/gkw257
- Rasmann S, De Vos M, Casteel CL, Tian D, Halitschke R, Sun JY, Agrawal AA, Felton GW, Jander G (2012) Herbivory in the Previous Generation Primes Plants for Enhanced Insect Resistance *Plant Physiology* 158 (2):854-863. doi:10.1104/pp.111.187831
- Reinhardt G, Gärtner S, Wagner T (2020) Ökologischer Fußabdruck von Lebensmitteln und Gerichten in Deutschland. ifeu - Institut für Energie- und Umweltforschung Heidelberg Abgerufen von <https://www.ifeu.de>
- Röhlen-Schmittgen S, Körner T, Gierholz R, Hanten S, Roß F, Zinkernagel J (2023) Thermopriming in the early phase of tomato development leads to plant tolerance. *Acta Horticulturae* (1372):155-162. doi:10.17660/ActaHortic.2023.1372.21
- Rosales MA, Cervilla LM, Sánchez-Rodríguez E, Rubio-Wilhelmi MdM, Blasco B, Ríos JJ, Soriano T, Castilla N, Romero L, Ruiz JM (2011) The effect of environmental conditions on nutritional quality of cherry tomato fruits: evaluation of two experimental Mediterranean greenhouses. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 91 (1):152-162. doi:<https://doi.org/10.1002/jsfa.4166>
- Ross-Innes CS, Stark R, Teschendorff AE, Holmes KA, Ali HR, Dunning MJ, Brown GD, Gojis O, Ellis IO, Green AR, Ali S, Chin SF, Palmieri C, Caldas C, Carroll JS (2012) Differential oestrogen receptor binding is associated with clinical outcome in breast cancer. *Nature* 481 (7381):389-393. doi:10.1038/nature10730

- Ross (2023) The sustainable development goals report: special edition towards a rescue plan for people and planet. United Nations, Department of Economic and Social Affairs Statistics Division, New York, NY
- Rossatto T, Souza GM, do Amaral MN, Auler PA, Pérez-Alonso M-M, Pollmann S, Braga EJB (2023) Cross-stress memory: Salt priming at vegetative growth stages improves tolerance to drought stress during grain-filling in rice plants. *Environmental and Experimental Botany* 206:105187. doi:<https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2022.105187>
- Santos ALD, Chaves-Silva S, Yang L, Maia LGS, Chalfun-Junior A, Sinharoy S, Zhao J, Benedito VA (2017) Global analysis of the MATE gene family of metabolite transporters in tomato. *BMC Plant Biol* 17 (1):185. doi:10.1186/s12870-017-1115-2
- Sato S, Peet MM, Thomas JF (2000) Physiological factors limit fruit set of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) under chronic, mild heat stress. *Plant, Cell & Environment* 23 (7):719-726. doi:<https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.2000.00589.x>
- Semagn K, Babu R, Hearne S, Olsen M (2014) Single nucleotide polymorphism genotyping using Kompetitive Allele Specific PCR (KASP): overview of the technology and its application in crop improvement. *Molecular Breeding* 33 (1):1-14. doi:10.1007/s11032-013-9917-x
- Serrano N, Ling Y, Bahieldin A, Mahfouz MM (2019) Thermopriming reprograms metabolic homeostasis to confer heat tolerance. *Sci Rep* 9 (1):181. doi:10.1038/s41598-018-36484-z
- Shaheen MR, Ayyub CM, Amjad M, Waraich EA (2016) Morpho-physiological evaluation of tomato genotypes under high temperature stress conditions: Evaluation of tomato genotypes under high temperature stress. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 96 (8):2698-2704. doi:10.1002/jsfa.7388
- Sharma A, Kumar V, Shahzad B, Tanveer M, Sidhu GPS, Handa N, Kohli SK, Yadav P, Bali AS, Parihar RD, Dar OI, Singh K, Jasrotia S, Bakshi P, Ramakrishnan M, Kumar S, Bhardwaj R, Thukral AK (2019) Worldwide pesticide usage and its impacts on ecosystem. *SN Applied Sciences* 1 (11):1446. doi:10.1007/s42452-019-1485-1
- Shi H, Ishitani M, Kim C, Zhu JK (2000) The Arabidopsis thaliana salt tolerance gene SOS1 encodes a putative Na⁺/H⁺ antiporter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 (12):6896-6901. doi:10.1073/pnas.120170197
- Sims DA, Gamon JA (2002) Relationships between leaf pigment content and spectral reflectance across a wide range of species, leaf structures and developmental stages. *Remote Sensing of Environment*, vol 81.
- Singh P, Yekondi S, Chen PW, Tsai CH, Yu CW, Wu K, Zimmerli L (2014) Environmental History Modulates Arabidopsis Pattern-Triggered Immunity in a HISTONE ACETYLTRANSFERASE1-Dependent Manner. *Plant Cell* 26 (6):2676-2688. doi:10.1105/tpc.114.123356
- Singleton VL, Rossi JA (1965) Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *American Journal of Enology and Viticulture* 16 (3):144. doi:10.5344/ajev.1965.16.3.144
- Slaughter A, Daniel X, Flors V, Luna E, Hohn B, Mauch-Mani B (2012) Descendants of Primed Arabidopsis Plants Exhibit Resistance to Biotic Stress. *Plant Physiology* 158 (2):835-843. doi:10.1104/pp.111.191593
- Solovchenko AE, Chivkunova OB, Merzlyak MN, Reshetnikova IV (2001) A spectrophotometric analysis of pigments in apples. *Russian Journal of Plant Physiology*, vol 48.
- Springer NM (2013) Epigenetics and crop improvement. *Trends in Genetics* 29 (4):241-247. doi:<https://doi.org/10.1016/j.tig.2012.10.009>
- Stassen JHM, Lopez A, Jain R, Pascual-Pardo D, Luna E, Smith LM, Ton J (2018) The relationship between transgenerational acquired resistance and global DNA methylation in Arabidopsis. *Sci Rep* 8 (1):14761. doi:10.1038/s41598-018-32448-5
- Stiehler F, Steinborn M, Scholz S, Dey D, Weber APM, Denton AK (2021) Helixer: cross-species gene annotation of large eukaryotic genomes using deep learning. *Bioinformatics* 36 (22-23):5291-5298. doi:10.1093/bioinformatics/btaa1044

- Storck V, Karpouzas DG, Martin-Laurent F (2017) Towards a better pesticide policy for the European Union. *Science of The Total Environment* 575:1027-1033.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.09.167>
- Syngenta (2018) Bion. SICHERHEITSDATENBLATT gemäß Verordnung Nr 1907/2006 7–8
- Tanner H, Brunner H (1987) Getränke-Analytik: Untersuchungsmethoden für die Labor- und Betriebspraxis 2., Aufl. C. Schliessmann Kellerei - Chemie GmbH & KG,
- Thomas DTT, Challabathula D, Puthur JT (2019) UV-B priming of *Oryza sativa* var. Kanchana seedlings augments its antioxidative potential and gene expression of stress-response proteins under various abiotic stresses. *3 Biotech* 9 (10):375. doi:10.1007/s13205-019-1903-5
- Tohge T, Nishiyama Y, Hirai MY, Yano M, Nakajima J, Awazuha M, Inoue E, Takahashi H, Goodenowe DB, Kitayama M, Noji M, Yamazaki M, Saito K (2005) Functional genomics by integrated analysis of metabolome and transcriptome of *Arabidopsis* plants over-expressing an MYB transcription factor. *Plant J* 42 (2):218-235. doi:10.1111/j.1365-313X.2005.02371.x
- Traw MB, Kniskern JM, Bergelson J (2007) SAR increases fitness of *Arabidopsis thaliana* in the presence of natural bacterial pathogens. *Evolution* 61 (10):2444-2449.
doi:10.1111/j.1558-5646.2007.00211.x
- van Hulten M, Pelser M, van Loon LC, Pieterse CMJ, Ton J (2006) Costs and benefits of priming for defense in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103 (14):5602-5607. doi:10.1073/pnas.0510213103
- Verhagen BWM, Glazebrook J, Zhu T, Chang H-S, van Loon LC, Pieterse CMJ (2004) The Transcriptome of Rhizobacteria-Induced Systemic Resistance in *Arabidopsis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*® 17 (8):895-908. doi:10.1094/mpmi.2004.17.8.895
- Viquez-Zamora M, Vosman B, van de Geest H, Bovy A, Visser RGF, Finkers R, van Heusden AW (2013) Tomato breeding in the genomics era: insights from a SNP array. *BMC Genomics* 14 (1):354. doi:10.1186/1471-2164-14-354
- Vlot AC, Dempsey D, apos, Amick M, Klessig DF (2009) Salicylic Acid, a Multifaceted Hormone to Combat Disease. *Annual Review of Phytopathology* 47 (Volume 47, 2009):177-206.
doi:<https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.050908.135202>
- Vlot AC, Sales JH, Lenk M, Bauer K, Brambilla A, Sommer A, Chen Y, Wenig M, Nayem S (2021) Systemic propagation of immunity in plants. *New Phytologist* 229 (3):1234-1250.
doi:<https://doi.org/10.1111/nph.16953>
- Wang X, Vignjevic M, Liu F, Jacobsen S, Jiang D, Wollenweber B (2014) Drought priming at vegetative growth stages improves tolerance to drought and heat stresses occurring during grain filling in spring wheat. *Plant Growth Regulation* 75 (3):677-687.
doi:10.1007/s10725-014-9969-x
- Wang Y, Zhang Y, Gao Z, Yang W (2018) Breeding for Resistance to Tomato Bacterial Diseases in China: Challenges and Prospects. *Horticultural Plant Journal* 4 (5):193-207.
doi:10.1016/j.hpj.2018.08.004
- Wenig M, Ghirardo A, Sales JH, Pabst ES, Breitenbach HH, Antritter F, Weber B, Lange B, Lenk M, Cameron RK, Schnitzler J-P, Vlot AC (2019) Systemic acquired resistance networks amplify airborne defense cues. *Nature Communications* 10 (1):3813.
doi:10.1038/s41467-019-11798-2
- Westman SM, Kloth KJ, Hanson J, Ohlsson AB, Albrechtsen BR (2019) Defence priming in *Arabidopsis* - a Meta-Analysis. *Sci Rep* 9 (1):13309. doi:10.1038/s41598-019-49811-9
- Wibowo A, Becker C, Marconi G, Durr J, Price J, Hagmann J, Papareddy R, Putra H, Kageyama J, Becker J, Weigel D, Gutierrez-Marcos J (2016) Hyperosmotic stress memory in *Arabidopsis* is mediated by distinct epigenetically labile sites in the genome and is restricted in the male germline by DNA glycosylase activity. *eLife* 5:e13546.
doi:10.7554/eLife.13546
- Wickham H (2016) ggplot2 - Elegant Graphics for Data Analysis (2nd Edition). Springer-Verlag New York 77 (Book Review 2). doi:10.18637/jss.v077.b02

- Wold S, Johansson E, Cocchi M (1993) PLS: Partial Least Squares Projections to Latent Structures. In: 3D QSAR in Drug Design: Theory, Methods and Applications. Kluwer ESCOM Science Publisher, pp 523 - 550
- Wu Y-R, Lin Y-C, Chuang H-w (2016) Laminarin modulates the chloroplast antioxidant system to enhance abiotic stress tolerance partially through the regulation of the defensin-like gene expression. *Plant Science* 247:83-92.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2016.03.008>
- Xie F, Wang J, Zhang B (2023) RefFinder: a web-based tool for comprehensively analyzing and identifying reference genes. *Funct Integr Genomics* 23 (2):125. doi:10.1007/s10142-023-01055-7
- Xiong Y, Wang S, Cui C, Wu X, Zhu J (2023) Suaeda salsa NRT1.1 Is Involved in the Regulation of Tolerance to Salt Stress in Transgenic Arabidopsis. *Int J Mol Sci* 24 (16).
doi:10.3390/ijms241612761
- Xu Y, Charles MT, Luo Z, Mimee B, Tong Z, Veronneau PY, Roussel D, Rolland D (2019) Ultraviolet-C priming of strawberry leaves against subsequent *Mycosphaerella fragariae* infection involves the action of reactive oxygen species, plant hormones, and terpenes. *Plant Cell Environ* 42 (3):815-831. doi:10.1111/pce.13491
- Yan L (2021) Draw Venn Diagram by "ggplot2". Version 0.1.8.
- Yassin M, Ton J, Rolfe SA, Valentine TA, Cromey M, Holden N, Newton AC (2021) The rise, fall and resurrection of chemical-induced resistance agents. *Pest Management Science* 77 (9):3900-3909. doi:<https://doi.org/10.1002/ps.6370>
- You H, Liu Y, Minh TN, Lu H, Zhang P, Li W, Xiao J, Ding X, Li Q (2020) Genome-wide identification and expression analyses of nitrate transporter family genes in wild soybean (*Glycine soja*). *Journal of Applied Genetics* 61 (4):489-501. doi:10.1007/s13353-020-00571-7
- Yu G, Wang L, He Q (2015) ChIPseeker: an R/Bioconductor package for ChIP peak annotation, comparison and visualization. *Bioinformatics* 31 (14)
- Yung W-S, Wang Q, Chan L-Y, Wang Z, Huang M, Li M-W, Wong F-L, Lam H-M (2024) DNA Hypomethylation Is One of the Epigenetic Mechanisms Involved in Salt-Stress Priming in Soybean Seedlings. *Plant, Cell & Environment*. doi:<https://doi.org/10.1111/pce.15297>
- Zhao D, MacKown CT, Starks PJ, Kindiger BK (2010) Rapid Analysis of Nonstructural Carbohydrate Components in Grass Forage Using Microplate Enzymatic Assays. *Crop Science* 50 (4):1537-1545. doi:<https://doi.org/10.2135/cropsci2009.09.0521>
- Zhao S, Fernald RD (2005) Comprehensive algorithm for quantitative real-time polymerase chain reaction. *J Comput Biol* 12 ((8)). doi:10.1089/cmb.2005.12.1047
- Zhao Z, Li M, Xu W, Liu J-H, Li C (2022) Genome-Wide Identification of NRT Gene Family and Expression Analysis of Nitrate Transporters in Response to Salt Stress in *Poncirus trifoliata*. *Genes* 13 (7):1115
- Zhou R, Yu X, Li X, Mendanha dos Santos T, Rosenqvist E, Ottosen C-O (2020) Combined high light and heat stress induced complex response in tomato with better leaf cooling after heat priming. *Plant Physiology and Biochemistry* 151:1-9.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.03.011>
- Zushi K, Fukuda T, Mori Y, Takahashi H, Kirimura M (2022) Seasonal Variation and a Statistical Predictive Model in Assessing Health-promoting Properties of Cherry Tomato under Long-term Cultivation. *Environment Control in Biology* 60 (1):91-101.
doi:10.2525/ecb.60.91

10. Übersicht über alle im Berichtszeitraum vom Projektnehmer realisierten Veröffentlichungen zum Projekt (Printmedien, Newsletter usw.), bisherige und geplante Aktivitäten zur Verbreitung der Ergebnisse

10.1. Publikationen in peer-reviewten Journalen

- Röhlen-Schmittgen, S.; Körner, T.; Gierholz, R.; Hanten, S.; Roß, F. and Zinkernagel, J. (2023). Thermopriming in the early phase of tomato development leads to plant tolerance. *Acta Hortic.* 1372, 155-162
<https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2023.1372.21>
- Körner, T.; Zinkernagel, J.; Röhlen-Schmittgen, S. Induction of Time-Dependent Tolerance through Thermopriming in Tomatoes. *Sustainability* **2024**, 16, 1163.
<https://doi.org/10.3390/su16031163>
- Körner, T.; Zinkernagel, J.; Röhlen-Schmittgen, S. Thermopriming Induces Time-Limited Tolerance to Salt Stress. *Int J Mol Sci.* **2024** Jul 13;25(14):7698.
<https://doi.org/10.3390/ijms25147698>.
- Körner, T.; Gierholz, R.; Zinkernagel, J.; Röhlen-Schmittgen, S. Heat-Induced Cross-Tolerance to Salinity Due to Thermopriming in Tomatoes. *Metabolites* **2024**, 14, 213.
<https://doi.org/10.3390/metabo14040213>
- Auge, G.; Hankofer, V.; Groth, M.; Antoniou-Kourounioti, R.; Ratikainen, I.; Lampei, C. Plant environmental memory: implications, mechanisms and opportunities for plant scientists and beyond. *AoB PLANTS* **2023**, Volume 15, Issue 4, July 2023, plad032,
<https://doi.org/10.1093/aobpla/plad032>
- Körner, T.; Zinkernagel, J.; Röhlen-Schmittgen, S. Physiological and Metabolic Responses of Tomato Varieties to Salinity Stress After Thermopriming. *Stresses* **2025**,
<https://doi.org/10.3390/stresses5020027>

Geplante Publikationen in peer-reviewten Journalen

- Sara Beier, Anna Hildebrand, Sarah Spettmann, Sebastian Beier, Franziska Genzel, Anika Wiese-Klinkenberg: **Salt-Priming Increases Salt Stress Tolerance of Young Tomato Plants by Modification of Salt Stress Response and Earlier Induction of Protective Mechanisms (in preparation)**
- Samaneh Bagheri, Anna Sommer, Veena Lal, Martin Groth, A. Corina Vlot-Schuster: **Early Exposure to Salt Increases the Resistance of Tomato Leaves against *Alternaria alternata* by Priming Gene Expression Changes (in preparation)**

10.2. Publikationen in nicht peer-reviewten Journalen

- Dr. Anika-Wiese-Klinkenberg, Tobias Körner, Dr. Simone Röhlen-Schmittgen „**Priming“ an Tomatenjungpflanzen - Durch Erinnerungen besser mit Stress umgehen** , erschienen in Gemüse 04/2023, <https://www.gemuese-online.de/magazin/archiv/article-7502580-206224/durch-erinnerungen-besser-mit-stress-umgehen-.html>

10.3. Konferenzen, Posterbeiträge, Vorträge

- **Hortstresses 2022, University of Reading (und online), 29.03.– 30.03.2022**
Posterbeitrag: F. Genzel, M. Groth, A. C. Vlot; C. Whitney, S. Röhlen-Schmittgen, A. Wiese-Klinkenberg: HortiPrimed – Establishing ‚Priming‘ on Young Tomato Plants as a Plant Protection Method in Horticulture
- **31st International Horticultural Congress (IHC) in Angers 2022, 14.–20. 08.2022**
Posterbeitrag: S. Röhlen-Schmittgen, T. Körner, R. Gierholz, S. Hanten, F. Roß, J. Zinkernagel: Thermopriming in the early phase of tomato development leads to improved plant tolerance
- **55. Jahrestagung der Deutschen Gartenbauwissenschaftlichen Gesellschaft e.V. und des BHGL e.V. in Osnabrück 01.03. – 03.03.2023**
 - **Vortrag:** S. Beier; A. Hildebrand; F. Genzel; A. Wiese-Klinkenberg: ‘Priming’ on young tomato plants as a crop protection method – impact of salt priming on salt stress tolerance
 - **Posterpräsentation** T. Körner, R. Gierholz, J. Zinkernagel, S. Röhlen-Schmittgen: Impact of thermopriming on the stress tolerance of tomato plants
- **XVIII. Internationale Solanaceae-Genomkonferenz 2023, McGill Universität, in Montreal Kanada, 14 10.- – 18.10.2023**
Posterbeitrag: S. Beier, A. Hildebrand, F. Genzel, A. Wiese-Klinkenberg: HortiPrimed – Impact of abiotic stress priming on young tomato plants as a crop protection method
- **GFPi Jahrestagung - „Abteilungssitzung Gemüse, Heil- und Gewürzpflanzen“ in Bonn, 08.11.2023**
Vortrag zur Projektvorstellung (A. Wiese-Klinkenberg)
- **56. Jahrestagung der Deutschen Gartenbauwissenschaftlichen Gesellschaft e.V. und des BHGL e.V. am Thünen-Institut in Braunschweig 28.02 – 01.03.2024**
 - **Posterbeitrag** T. Körner, J. Zinkernagel, A. Wiese-Klinkenberg, S. Röhlen-Schmittgen: Interaction of salt priming with various stressors in tomato production
 - **Posterbeitrag:** S. Beier, A. Hildebrand, F. Genzel, A. Wiese-Klinkenberg: HortiPrimed – Impact of abiotic stress priming on young tomato plants as a crop protection method
- **HortiSustain Statusseminar & Vernetzungstreffen, IG Farbenhaus Frankfurt, 20.03.2024**
Vortrag zur Projektvorstellung (A. Wiese-Klinkenberg) und Poster.
- **PlantBioProTech & International Organization for Biological and Integrated Control – Induced Resistance, Castelló de la Plana, Spain, 17.-20.06.2024.**
Posterbeitrag: S. Bagheri, A.C. Vlot: Tomato stress priming: Shielding against biotic threats

- **EPIPLANT/SEB 2024 Joint Conference „Plant Epigenetics”, Clermont-Ferrand, Frankreich, 10. – 12.07.2024**
Posterbeitrag S. T. Mohan, J. Hoxha, S. Beier, A. Wiese-Klinkenberg, M. Groth „Salt-priming of tomato seedlings leads to distinct epigenetic changes and increased abiotic stress resistance”.
- **„Agrarforschungstag NRW 2024“ des Ministeriums für Landwirtschaft und Verbraucherschutz des Landes Nordrhein-Westfalen, 29.08.2024**
Posterbeitrag S. Moon, J.-B. Schulz Lutum, C. Whitney: Wirtschaftliche und ökologische Entscheidungsanalyse der Tomatensämlings- und Tomatenproduktion mit Priming
- **Botanik-Tagung, the International Conference of the German Society for Plant Sciences (DBG), in Halle (Saale), 15.09. – 19.09.2024**
Posterbeitrag S. Beier, F. Genzel, A. Wiese-Klinkenberg: Salt-priming induced salt tolerance in young tomato plants
- **XIX. Internationale Solanaceae-Genomkonferenz 2024, Tsukuba International Congress Center Tsukuba, Japan 25. 11.- 28.11.2024**
Posterbeitrag S. Beier, F. Genzel, A. Wiese-Klinkenberg: Salt-priming induced salt tolerance in young tomato plants
- **8. International BioSC Symposium, LVR Landesmuseum Bonn 27. -28.01.2025**
Posterbeitrag S. Beier, S. Beier, F. Genzel, A. Wiese-Klinkenberg Salt-priming effects on salinity tolerance of young tomato plants – a method to induce abiotic stress tolerance in tomato production?
- **57. Jahrestagung der Deutschen Gartenbauwissenschaftlichen Gesellschaft e.V. und des BHGL e.V. in Essen 26.02 – 01.03.2025**
Vortrag S. Beier, S. Beier, S. Spettmann, F. Genzel, A. Wiese-Klinkenberg: Salt-priming effects on salinity tolerance of young tomato plants and underlying molecular mechanisms.
- **XXVI International Conference of the Society for Human Ecology in Mons, Belgium, 18.06. – 21.06.2025.**
Posterbeitrag S. Moon, C. Whitney: Decision Analysis for Linking Science and Practice in Sustainable Tomato Cultivation
- **2025 International Society – Molecular Plant-Microbe Interactions, Cologne, Germany, 13.-17.07.2025.**
Posterbeitrag: S. Bagheri, A. Sommer, M. Groth, A.C. Vlot: Abiotic stress primes tomato immunity against *Alternaria alternata*

10.4. Abschlussarbeiten

Doktorarbeiten:

- Tobias Körner: "Effects of Thermopriming on Resilience to Subsequent Stress Conditions in Tomato (*Solanum Lycopersicum* L.)", Hochschule Geisenheim University, Institut für Gemüsebau. Januar 2025
- Samaneh Bagheri: "Effects of Salt Priming on Defense Responses of Tomato (*Solanum Lycopersicum* L.) against Pathogens", Universität Bayreuth, Fakultät für Lebenswissenschaften: Lebensmittel, Ernährung und Gesundheit. (Fortlaufend)

Bachelor und Masterarbeiten:

- **Bachelorarbeit:** "NaCl-priming of tomato plants: duration and stress communication" Haruna Gütlin, Technische Universität München in Kooperation mit Helmholtz Munich, Institut für Biochemische Pflanzenpathologie (BIOP). August, 2022
- **Bachelorarbeit:** „Auswirkungen von Kälte-Priming auf die Kälte-Stressreaktion bei Tomaten-Jungpflanzen“; Anna Hildebrand, Fachhochschule Aachen, Campus Jülich, Fachbereich Chemie und Biotechnologie, Studiengang Biotechnologie mit Praxissemester. Juni 2023
- **Bachelorarbeit:** „Auswirkungen von Salz-Priming auf die Salz- und Kälte-Stressreaktion bei Tomaten-Jungpflanzen“ Lara Holz, Fachhochschule Aachen, Campus Jülich, Fachbereich Chemie und Biotechnologie, Studiengang Biotechnologie mit Praxissemester. Juni 2024
- **Masterarbeit:** „Characterisation of the epigenetic signature of abiotic stress memory in tomato“, Jerina Hoxha, Master of Science in Molecular and Cellular Biology, Ludwig-Maximilians-Universität München, September 01, 2023.
- **Masterarbeit:** „Effekt von Hitzepriming auf die Anreicherung von Inhaltsstoffen in Blatt und Frucht von Tomate (*Solanum lycopersicum*)“; Ruven Gierholz, Hochschule Geisenheim University, Institut für Gemüsebau, Studiengang Spezielle Pflanzen- und Gartenbauwissenschaften. April 2024
- **Masterarbeit:** „Characterization of Epigenetic Alterations Associated with Salt Priming of Tomato Seedlings for Sustainable Crop Enhancement“, Shrinidhi Thottangal Mohan, Master of Science in Molecular and Cellular Biology, Ludwig-Maximilians-Universität München, January 27, 2025.
- **Masterarbeit:** „Einfluss von Hitzepriming auf den primären und sekundären Metabolismus sowie den Ertrag von Tomatenpflanzen unter Salzstress“; Rebecca Ochs, Hochschule Geisenheim University, Institut für Gemüsebau, Studiengang Spezielle Pflanzen- und Gartenbauwissenschaften. März 2025

- **Masterarbeit** „Decision Analysis of the Economic Potential of Priming Tomato Seedlings“ Sanghyo Moon, Universität Bonn, Institute of Crop Science and Resource Conservation (INRES). *In progress*

10.5. Material für die Öffentlichkeitsarbeit

Ein Englisch- und Deutschsprachiger Projektflyer wurde zu Beginn des Projektes erstellt und auf Konferenzen verbreitet und an Projektpartner und Praxisbeirat zur Weiterverbreitung verteilt. Der Flyer kann auf <https://www.hortisustain.de/projekte/boel/hortiprimed> heruntergeladen werden.

JÜLICH
Forschungszentrum
Institut für Bio- und Geowissenschaften,
Bioinformatik (BG4)
Dr. Anja Wiese-Vollbrecht
E-Mail: A.Wiese@fz-juelich.de
(Projektkoordination)

Hochschule Gelsenheim
University
Institut für Gemüsebau
Dr. Simone Röhlen-Schmittgen
E-Mail: Simone.RoehlenSchmittgen@hg-gm.de

HELMHOLTZ MUNICH
Institut für Funktionale Epigenetik (IFE)
Dr. Martin Grottel
E-Mail: Martin.Grottel@helmholtz-muenchen.de

UNIVERSITÄT BAYREUTH
Institut für Genetik der Nutzpflanzen
Prof. Dr. Cornelia Vico-Schaefer
E-Mail: Cornelia.Vico@uni-bayreuth.de

INRES Gartenbauwissenschaften
Dr. Cory Whitney
E-Mail: Cory.Whitney@uni-bonn.de

UNSER BERATUNGSGREMIUM:

gipmans

KUGA
www.ko-ga.eu

LLH
Kompetenz für Landwirtschaft und Gartenbau

Landwirtschaftskammer Nordrhein-Westfalen

LAUFZEIT: 01.01.2022 – 31.12.2024

Die Förderung des Projektes HortiPrimed erfolgt aus Mitteln des Bundesministeriums für Ernährung und Landwirtschaft (BMEL) aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages. Die Projektträgerschaft erfolgt über die Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung (BLE) im Rahmen des Bundesprogramms Ökologischer Landbau und andere Formen nachhaltiger Landwirtschaft.

HortiPrimed

Etablierung von „Priming“ an Tomaten-Jungpflanzen als Pflanzenschutzverfahren im Gartenbau

Gefördert durch

BUND
Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft

BÖLN
Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft

aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages

MOTIVATION FÜR UNSER HANDELN:

- Reduktion des Einsatzes von Pflanzenschutzmitteln
- Abmilderung klimawandelbedingter Anbauherausforderungen
- Förderung des Umweltschutzes

UNSERE ZIELE:

- Eine neue Strategie für nicht-chemischen Pflanzenschutz etablieren
- Eine alternative Pflanzenschutzmaßnahme zur nachhaltigen Pflanzenproduktion durch Stabilisierung oder Immunisierung von Pflanzen schaffen
- Spezifische Protokolle zur abiotischen Stressvorbehandlung in der Jungpflanzen-Produktion entwickeln

UNSER PROJEKTANSATZ AN TOMATE:

- Aufbau eines natürlichen Schutzmechanismus in Pflanzen
- Kontrollierte Stressanwendung zur gesteigerten Stressresistenz „Priming“
- Stabilisierung der Pflanze gegen Schädlinge und klimabedingte abiotische Stressoren

Auswirkungen von Stressfaktoren auf nicht geprimte, „unvorbereitete“ Pflanzen:

Auswirkungen von Stressfaktoren auf geprimte, „alarmierte“ Pflanzen:

Primingbedingungen in der Jungphase (Dauer, Intensität)

UNSER ARBEITSPLAN:

- Identifizierung optimaler Primingbedingungen
- Evaluierung der daraus hervorgehenden Pflanzentoleranz gegenüber Folgestressen
- Abschätzung von Primingeffekten auf den Ernteertrag
- Bewertung der Effektivität von Priming anhand von Biotests mit pathogenen Schädlerregern
- Bewertung anhand von biotischen Stressanwendungen
- Untersuchung von molekularen Mechanismen, durch Gen-Expressionsstudien und Analyse von DNA/Histon-Methylierung
- Entwicklung eines molekularen Nachweis des Primings
- Modellierung des holistischen Ansatzes zur Erfassung ökologischer und ökonomischer Effekte
- Einbringung und Multiplikation in Praxis durch involvierte Praxisbetriebe und Beratungsstellen für gartenbauliche Unternehmen

Abb. 10.3.1: Projektflyer (DE) Vorder- und Rückseite des 6-seitigen Formats.

Ein Projektvideo wurde mit der Firma peachfilms unter Organisation von Dr. Simone Röhlen-Schmittgen und mit Beteiligung aller Projektpartner geplant und erstellt (AP5.3). Das Projektvideo wurde den Projektpartnern sowie dem Praxisbeirat zur Weiterverbreitung zur Verfügung gestellt. Das Video kann u.a. unter diesem Link gefunden werden: <https://www.youtube.com/watch?v=N02VdUyMueQ> und ist auch auf der hortisustain-Projektseite verlinkt: <https://www.hortisustain.de/projekte/boel/hortiprimed>

Anhang zum öffentlichen Bericht

Tabelle A4.1.1: Mercator4 Anreicherungskategorien für DEGs zwischen ungeprimten und geprimten Pflanzen nach 24 Stunden Salzstress (PS vs. CS 24h). # Genes of interest bezieht sich auf die Gene in der entsprechenden Mapman4 Kategorie. Enrichment Factor >1 zeigen eine Überrepräsentation von Genen einer bestimmten Kategorie an. Enrichment Factor <1 zeigen eine Unterrepräsentation an.

MapMan4 category number	Context of Protein Function	#Genes of Interest	Enrichment Factor	FDR-adjusted p-value
11.4	Phytohormone action.cytokinin	11	5,02	7,44E-03
11.4.2	Phytohormone action.cytokinin.perception and signal transduction	10	10,35	1,11E-04
11.4.2.6	Phytohormone action.cytokinin.perception and signal transduction.A-type ARR response regulator	7	38,3	1,69E-05
12	Chromatin organisation	44	3,28	2,05E-08
12.1	Chromatin organisation.chromatin structure	30	16,18	1,97E-20
12.1.1	Chromatin organisation.chromatin structure.DNA wrapping	27	21,1	1,97E-20
12.1.1.1	Chromatin organisation.chromatin structure.DNA wrapping.histone H2A-H2B dimer	13	19,15	1,12E-08
12.1.1.1.1	Chromatin organisation.chromatin structure.DNA wrapping.histone H2A-H2B dimer.histone *(H2A/HTA)	7	20,62	1,50E-04
12.1.1.1.2	Chromatin organisation.chromatin structure.DNA wrapping.histone H2A-H2B dimer.histone *(H2B/HTB)	6	17,68	1,68E-03
12.1.1.2	Chromatin organisation.chromatin structure.DNA wrapping.histone H3-H4 tetramer	14	23,31	2,80E-10
12.1.1.2.1	Chromatin organisation.chromatin structure.DNA wrapping.histone H3-H4 tetramer.histone *(H3)	7	24,37	8,61E-05
12.1.1.2.2	Chromatin organisation.chromatin structure.DNA wrapping.histone H3-H4 tetramer.histone *(H4)	7	22,34	1,11E-04
13	Cell division	61	4,5	1,51E-15
13.1	Cell division.DNA replication	18	6,57	2,16E-06
13.1.1	Cell division.DNA replication.preinitiation	6	12,09	7,54E-03
13.1.1.2	Cell division.DNA replication.preinitiation.MCM replicative DNA helicase complex	4	25,53	1,77E-02
13.1.3	Cell division.DNA replication.elongation	8	12,26	4,68E-04
13.1.3.1	Cell division.DNA replication.elongation.DNA polymerase alpha complex	4	38,3	6,95E-03
13.2	Cell division.cell cycle organisation	28	5,31	3,80E-08
13.2.1	Cell division.cell cycle organisation.cell cycle control	12	4,64	6,95E-03
13.2.1.1	Cell division.cell cycle organisation.cell cycle control.CYCLIN regulatory protein activities	11	9,8	5,57E-05

13.2.1.1.1	Cell division.cell cycle organisation.cell cycle control.CYCLIN regulatory protein activities.regulatory protein *(CYCA)	7	29,79	4,41E-05
13.3	Cell division.meiotic recombination	9	5,56	1,77E-02
16	RNA processing	2	0,09	5,57E-05
18	Protein modification	8	0,28	3,37E-03
20.1	Cytoskeleton organisation.microtubular network	13	3,66	2,58E-02
22	Vesicle trafficking	0	0	1,38E-03
50	Enzyme classification	118	1,4	3,93E-02
50.4.2	Enzyme classification.EC_4 lyases.EC_4-2 carbon-oxygen lyase	10	6,08	4,45E-03
9	Secondary metabolism	19	4,85	3,50E-05
9.1.4	Secondary metabolism.terpenoids.terpene biosynthesis	8	16,13	1,11E-04
9.1.4.2	Secondary metabolism.terpenoids.terpene biosynthesis.mono-/sesquiterpene-/diterpene synthase	7	20,62	1,50E-04
9.2	Secondary metabolism.phenolics	11	7,39	4,00E-04
9.2.2	Secondary metabolism.phenolics.flavonoid biosynthesis	10	10,94	8,34E-05

Tabelle A4.1.2: Mercator4 Anreicherungskategorien für DEGs zwischen ungeprimten und geprimten Pflanzen nach 8 Tagen Salzstress (PS vs CS 8d). Genes of interest bezieht sich auf die Gene in der entsprechenden Mapman4 Kategorie. Enrichment Factor >1 zeigen eine Überrepräsentation von Genen einer bestimmten Kategorie an. Enrichment Factor <1 zeigen eine Unterrepräsentation an.

MapMan4 category number	Context of Protein Function	#Genes of Interest	Enrichment Factor	FDR-adjusted p-value
1	Photosynthesis	81	2,25	1,73E-06
1.1	Photosynthesis,photophosphorylation	68	2,56	6,83E-07
1.1.1	Photosynthesis,photophosphorylation,photosystem II	39	3,09	3,28E-05
1.1.1.1	Photosynthesis,photophosphorylation,photosystem II,LHC-II complex	18	8,41	3,97E-06
1.1.1.1.1	Photosynthesis,photophosphorylation,photosystem II,LHC-II complex,component *(LHCb1/2/3)	14	8,72	1,11E-04
1.1.4	Photosynthesis,photophosphorylation,photosystem I	16	4,82	2,49E-03
1.1.4.2	Photosynthesis,photophosphorylation,photosystem I,PS-I complex	11	6,43	8,73E-03
13	Cell division	24	0,44	5,11E-03
17	Protein biosynthesis	11	0,15	6,92E-14
17.1	Protein biosynthesis,ribosome biogenesis	2	0,06	7,18E-09
17.1.2	Protein biosynthesis,ribosome biogenesis,large ribosomal subunit (LSU)	2	0,1	1,78E-03
17.1.2.1	Protein biosynthesis,ribosome biogenesis,large ribosomal subunit (LSU),LSU proteome	0	0	1,78E-03

17.1.3	<i>Protein biosynthesis, ribosome biogenesis, small ribosomal subunit (SSU)</i>	0	0	2,07E-03
17.1.3.1	<i>Protein biosynthesis, ribosome biogenesis, small ribosomal subunit (SSU), SSU proteome</i>	0	0	4,23E-02
17.6	<i>Protein biosynthesis, organellar translation machinery</i>	5	0,24	4,23E-02
17.6.1	<i>Protein biosynthesis, organellar translation machinery, mitochondrial ribosome biogenesis</i>	0	0	3,17E-02
18.4.1.19	Protein modification, phosphorylation, TKL protein kinase families, Lectin receptor-like protein kinase families	23	3,52	1,96E-03
18.4.1.19.1	Protein modification, phosphorylation, TKL protein kinase families, Lectin receptor-like protein kinase families, G-Lectin protein kinase activity	19	3,95	3,08E-03
18.4.1.19.1.1	Protein modification, phosphorylation, TKL protein kinase families, Lectin receptor-like protein kinase families, G-Lectin protein kinase activity, SD-1 protein kinase	13	4,5	2,38E-02
19.2.2.9	Protein homeostasis, ubiquitin-proteasome system, ubiquitin-fold protein conjugation, HECT E3 ubiquitin ligase activities	8	7,48	4,23E-02
19.4.7	Protein homeostasis, proteolysis, protease inhibitor activities	14	3,85	4,11E-02
19.4.7.4	Protein homeostasis, proteolysis, protease inhibitor activities, PR6 protease inhibitor	10	6,68	1,57E-02
23	<i>Protein translocation</i>	6	0,23	5,19E-03
24	Solute transport	150	1,42	2,61E-02
24.1	Solute transport, primary active transport	33	2,17	4,52E-02
50	Enzyme classification	430	1,25	1,82E-03
50.1	Enzyme classification, EC_1 oxidoreductases	113	1,48	4,23E-02
50.1.13	Enzyme classification, EC_1 oxidoreductases, EC_1-14 oxidoreductase acting on paired donor with incorporation or reduction of molecular oxygen	66	2,24	5,52E-05

Tabelle A4.1.3: Mercator4 Anreicherungskategorien für DEGs in ungeprimten nach 24 Stunden Salzstress (CS vs. CC 24h). # Genes of interest bezieht sich auf die Gene in der entsprechenden Mapman4 Kategorie. Enrichment Factor >1 zeigen eine Überrepräsentation von Genen einer bestimmten Kategorie an.

MapMan4 category number	Context of Protein Function	#Genes of Interest	Enrichment Factor	FDR- adjusted p-value
11.1	Phytohormone action.abscisic acid	13	3,88	3,20E-02
11.1.2	Phytohormone action.abscisic acid.perception and signalling	10	4,92	3,50E-02
12.1	Chromatin organisation.chromatin structure	20	5,55	9,74E-06
12.1.1	Chromatin organisation.chromatin structure.DNA wrapping	17	6,83	9,74E-06
12.1.1.2	Chromatin organisation.chromatin structure.DNA wrapping.histone H3-H4 tetramer	11	9,42	2,54E-04
12.1.1.2.1	Chromatin organisation.chromatin structure.DNA wrapping.histone H3-H4 tetramer.histone *(H3)	6	10,74	3,20E-02
13	Cell division	48	1,86	3,68E-02
13.1	Cell division.DNA replication	21	3,94	4,58E-04
15.5.3.1.1	RNA biosynthesis.DNA-binding transcriptional regulation.helix-turn-helix DNA-binding domain.HOMEOD domain.HD-ZIP I/II-type transcription factor	8	6,57	3,36E-02
15.5.3.2.1	RNA biosynthesis.DNA-binding transcriptional regulation.helix-turn-helix DNA-binding domain.tryptophan-cluster structure.RADIALIS-type transcription factor	6	14,77	1,17E-02
16	<i>RNA processing</i>	20	0,46	4,04E-2
17	Protein biosynthesis	90	2,62	8,05E-12
17.1	Protein biosynthesis.ribosome biogenesis	81	4,81	7,54E-24
17.1.2	Protein biosynthesis.ribosome biogenesis.large ribosomal subunit (LSU)	52	5,6	3,15E-17
17.1.2.1	Protein biosynthesis.ribosome biogenesis.large ribosomal subunit (LSU).LSU proteome	47	6,91	2,80E-18
17.1.3	Protein biosynthesis.ribosome biogenesis.small ribosomal subunit (SSU)	29	4,36	8,75E-07
17.1.3.1	Protein biosynthesis.ribosome biogenesis.small ribosomal subunit (SSU).SSU proteome	28	5,81	7,28E-09
18.4.4.3	Protein modification.phosphorylation.CAMK protein kinase families.SnRK3 SNF1-related protein kinase	9	7,39	9,10E-03
18.5.1.2.1	Protein modification.dephosphorylation.protein serine/threonine phosphatase families.PPM/PP2C Mn/Mg-dependent phosphatase families.clade A phosphatase	7	12,53	7,19E-03
22	<i>Vesicle trafficking</i>	4	0,16	2,31E-4
24.2.2	Solute transport.carrier-mediated transport.MFS superfamily	25	2,81	7,33E-03
24.2.2.9	Solute transport.carrier-mediated transport.MFS superfamily.anion transporter *(NRT1/PTR)	13	4,13	2,10E-02

27.8.6	Multi-process regulation.calcium-dependent signalling.CBL-CIPK calcium sensor and kinase pathways	10	5,79	1,48E-02
27.8.6.2	Multi-process regulation.calcium-dependent signalling.CBL-CIPK calcium sensor and kinase pathways.CBL-dependent protein kinase *(CIPK)	9	7,09	1,12E-02
5.5	Lipid metabolism.phytosterol metabolism	14	7,07	1,23E-04
5.5.1	Lipid metabolism.phytosterol metabolism.plant sterol pathway	9	11,82	6,10E-04

Tabelle A4.1.4: Mercator4 Anreicherungskategorien für DEGs in ungeprimten nach 8 Tagen Salzstress (CS vs CC 8d). # Genes of interest bezieht sich auf die Gene in der entsprechenden Mapman4 Kategorie. Enrichment Factor >1 zeigen eine Überrepräsentation von Genen einer bestimmten Kategorie an. Enrichment Factor <1 zeigen eine Unterrepräsentation an.

MapMan4 category number	Context of Protein Function	#Genes of Interest	Enrichment Factor	FDR- adjusted p-value
1	Photosynthesis	102	1,8	3,90E-01
1.1	Photosynthesis.photophosphorylation	80	1,91	9,20E-01
1.1.1.1	Photosynthesis.photophosphorylation.photosystem II.LHC-II complex	15	4,44	1,74E+01
1.1.1.1.1	Photosynthesis.photophosphorylation.photosystem II.LHC-II complex.component *(LHCb1/2/3)	13	5,13	1,93E+01
1.1.4	Photosynthesis.photophosphorylation.photosystem I	18	3,44	3,16E+01
11	Phytohormone action	151	1,68	3,67E-02
12	Chromatin organisation	43	0.53	6,17E+00
12.4	Chromatin organisation.nucleosome remodeling	2	0.12	1,28E+01
15.3	RNA biosynthesis.RNA polymerase II-dependent transcription	6	0.23	8,77E+00
16	RNA processing	53	0.37	4,23E-10
16.1	RNA processing.pre-RNA splicing	11	0.35	3,16E+01
16.2	RNA processing.RNA modification	14	0.39	4,67E+01
16.6	RNA processing.organelle RNA processing machinery	7	0.23	1,47E+00
17	Protein biosynthesis	17	0.15	6,81E-20
17.1	Protein biosynthesis.ribosome biogenesis	4	0.07	3,70E-11
17.1.2	Protein biosynthesis.ribosome biogenesis.large ribosomal subunit (LSU)	3	0.1	2,47E-03
17.1.2.1	Protein biosynthesis.ribosome biogenesis.large ribosomal subunit (LSU).LSU proteome	0	0	1,31E-03
17.1.3	Protein biosynthesis.ribosome biogenesis.small ribosomal subunit (SSU)	1	0.05	3,67E-02

17.1.3.1	<i>Protein biosynthesis.ribosome biogenesis.small ribosomal subunit (SSU).SSU proteome</i>	1	0.06	3,74E+00
17.6	<i>Protein biosynthesis.organellar translation machinery</i>	11	0.34	2,64E+01
19.2	<i>Protein homeostasis.ubiquitin-proteasome system</i>	86	0.67	4,32E+01
22	<i>Vesicle trafficking</i>	28	0.33	1,29E-05
23	<i>Protein translocation</i>	9	0.22	1,61E-02
24	<i>Solute transport</i>	221	1,32	4,32E+01
50	<i>Enzyme classification</i>	695	1,28	2,11E-04
50.1	<i>Enzyme classification.EC_1 oxidoreductases</i>	217	1,8	3,97E-07
50.1.13	<i>Enzyme classification.EC_1 oxidoreductases.EC_1-14 oxidoreductase acting on paired donor with incorporation or reduction of molecular oxygen</i>	111	2,38	5,00E-07
50.2.4	<i>Enzyme classification.EC_2 transferases.EC_2-4 glycosyltransferase</i>	74	1,7	3,16E+01
9.2	<i>Secondary metabolism.phenolics</i>	26	2,7	3,16E+01

Tabelle A4.1.5: Gene aus der MapMan-Kategorie Photosynthese für den Vergleich geprimter zu ungeprimten Pflanzen in Salzstress (PS vs. CS) und für den Vergleich ungeprimter Pflanzen im Salzstress zu Kontrollpflanzen. Blau: niedrige/negative Werte, Rot: hohe Werte. Gezeigt ist die x-Fache Änderung der DEG in den Vergleichen im Log2

Gen-Identifikationsnummer	Log2 fold change SS vs CS	Log2 fold change CS vs. CC
M82_HG975513.1_000031.1		-1,24
M82_HG975513.1_000119.1		-2,3
M82_HG975513.1_000263.1		-1,02
M82_HG975513.1_001370.1	-3,31	2,27
M82_HG975513.1_001550.1	1,35	
M82_HG975513.1_001551.1	1,66	-1,12
M82_HG975513.1_001602.1		-1,03
M82_HG975513.1_001752.1	1,47	-1,69
M82_HG975513.1_001816.1	1,1	-1,17
M82_HG975513.1_002014.1		-1,29
M82_HG975513.1_002112.1		1,53
M82_HG975513.1_002305.1	-1,54	6,76
M82_HG975513.1_002645.1	1,09	
M82_HG975513.1_003607.1	1,64	-3,58
M82_HG975513.1_003609.1		-2,36
M82_HG975514.1_000045.1	1,01	-1,05
M82_HG975514.1_000253.1	1,81	-1,83
M82_HG975514.1_000324.1	1,03	
M82_HG975514.1_000353.1	1,13	-1,22
M82_HG975514.1_000518.1	2,28	-1,35
M82_HG975514.1_000519.1	3,38	-2,83
M82_HG975514.1_000520.1	3,6	-2,82
M82_HG975514.1_000521.1	3,66	-3,4
M82_HG975514.1_000522.1	3,59	-3,52
M82_HG975514.1_000523.1	2,83	-2,2
M82_HG975514.1_000524.1	1,94	-1,37

M82_HG975514.1_000525.1	1,22	
M82_HG975514.1_000816.1		-1,12
M82_HG975514.1_000844.1		2,15
M82_HG975514.1_001063.1	1,37	-1,3
M82_HG975514.1_001105.1	2,64	
M82_HG975514.1_001855.1	1,23	-1,02
M82_HG975514.1_002184.1	1,11	-1,08
M82_HG975514.1_002506.1	1,12	-1,25
M82_HG975514.1_002507.1	1,26	-1,15
M82_HG975515.1_000038.1	1,73	-2,04
M82_HG975515.1_000039.1	2,82	-3,16
M82_HG975515.1_000341.1	1,29	
M82_HG975515.1_001080.1	1,04	-1,3
M82_HG975515.1_001125.1	1,38	-1,35
M82_HG975515.1_001787.1		-1,02
M82_HG975515.1_002480.1		-1,32
M82_HG975516.1_000170.1	1,3	-1,15
M82_HG975516.1_001409.1	1,58	-1,24
M82_HG975516.1_001440.1	1,31	-1,51
M82_HG975516.1_001976.1	-1,15	2,45
M82_HG975516.1_002442.1	-3,06	3,19
M82_HG975516.1_002603.1	-1,42	2,78
M82_HG975517.1_001091.1	1,23	-1,36
M82_HG975517.1_001531.1	1,24	
M82_HG975518.1_000714.1	1,66	-1,79
M82_HG975518.1_000819.1	3,72	-4,02
M82_HG975518.1_001194.1	1,06	
M82_HG975518.1_001196.1		-1,21
M82_HG975518.1_001222.1	1,28	-1,47
M82_HG975518.1_001237.1	1,51	-1,65
M82_HG975518.1_001539.1	1,69	-1,48
M82_HG975518.1_001807.1		-1,08
M82_HG975518.1_001922.1	1,41	-1,32
M82_HG975519.1_000076.1		-1,31
M82_HG975519.1_000348.1		-1,49
M82_HG975519.1_000905.1	-2,72	5,02
M82_HG975519.1_001101.1	1,23	-1,31
M82_HG975519.1_001273.1	2,12	-2,25
M82_HG975519.1_001485.1	1,17	
M82_HG975519.1_001658.1	1,82	-1,82
M82_HG975519.1_001699.1		-1,09
M82_HG975520.1_000165.1		1,55
M82_HG975520.1_000431.1		1,11
M82_HG975520.1_001106.1	1,26	-1,42
M82_HG975520.1_001906.1	1,79	-2,11
M82_HG975520.1_002027.1	1,48	-1,78
M82_HG975521.1_000209.1		-1,14
M82_HG975521.1_000319.1		-1,31
M82_HG975521.1_000439.1		-1,08
M82_HG975521.1_000598.1	1,14	-1,27
M82_HG975521.1_001327.1		2,31
M82_HG975521.1_001405.1		2,57
M82_HG975521.1_000961.1	1,05	
M82_HG975521.1_001607.1	1,21	-1,47
M82_HG975521.1_001671.1	1,18	-1,1
M82_HG975521.1_001914.1	1,17	
M82_HG975521.1_001975.1	1,2	1,04
M82_HG975522.1_000003.1	1,07	-1,03
M82_HG975522.1_000021.1	1,12	
M82_HG975522.1_000052.1	1,07	-1,04
M82_HG975522.1_000070.1		-1,22
M82_HG975522.1_000625.1	1,63	
M82_HG975522.1_000676.1	1,26	-1,43
M82_HG975522.1_001067.1		-1,48
M82_HG975522.1_001084.1	1,43	-1,93
M82_HG975522.1_001215.1		-4,3

M82_HG975522.1_001613.1	1,5	-1,2
M82_HG975522.1_001811.1	1,43	-1,76
M82_HG975522.1_002082.1	1,05	
M82_HG975523.1_000771.1		1,07
M82_HG975523.1_001183.1		-1,24
M82_HG975523.1_001816.1		-1,4
M82_HG975524.1_000163.1	2,48	-1,77
M82_HG975524.1_000164.1	1,56	-1,7
M82_HG975524.1_000165.1	1,64	-2,32
M82_HG975524.1_000288.1	1,54	-1,08
M82_HG975524.1_000864.1		-1,08
M82_HG975524.1_001032.1	1,48	-1,2
M82_HG975524.1_001508.1	1,42	
M82_HG975524.1_001850.1	1,78	-1,83
M82_HG975524.1_001917.1	1,12	-1,55
M82_HG975524.1_001936.1	1,34	-1,79
M82_HG975524.1_002034.1	2,04	-2,73
M82_HG975525.1_000001.1		-1,46
M82_HG975525.1_000029.1		-1,83
M82_HG975525.1_000030.1		-1,45
M82_HG975525.1_000046.1		-2,33
M82_HG975525.1_000047.1	2,88	-4,3
M82_HG975525.1_000051.1		-1,51
M82_HG975525.1_000056.1		-1,29
M82_HG975525.1_000058.1	2,65	-3,45