Schlussbericht

zum Vorhaben

Thema:

Verbundvorhaben: Charakterisierung des Proteoms unter Stickstoff- und Wassermangelstress als Grundlage für die züchterische Entwicklung stickstoffeffizienter und trockentoleranter Stärkekartoffeln; Teilvorhaben 3: Untersuchungen des Proteoms unter Trockenstress

Zuwendungsempfänger:

Leibniz Universität Hannover - Naturwissenschaftliche Fakultät
Institut für Gartenbauliche Produktionssysteme
Abteilung Gehölz- und Vermehrungsphysiologie
(ehemals: Abteilung Baumschule)
Herrenhäuser Str. 2
30419 Hannover

Förderkennzeichen:

22023511 bzw. **11NR235**

Laufzeit:

15.11.2012 bis **14.03.2016**

Monat der Erstellung:

06/2016

Datum der Veröffentlichung:

05.12.2016

Gefördert durch:

Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft

aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages

Das diesem Bericht zugrunde liegende Vorhaben wurde aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages mit Mitteln des Bundesministeriums für Ernährung und Landwirtschaft (BMEL) über die Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V. (FNR) als Projektträger des BMEL für das Förderprogramm Nachwachsende Rohstoffe unterstützt. Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt beim Autor.

Berichtsblatt - Kurzfassung des Vorhabens[1]

Zuwendungsempfänger: Leibniz Universität Hannover; Institut für Gartenbauliche Produktionssysteme; Abteilung Gehölz- und Vermehrungsphysiologie; Prof. Dr. Traud Winkelmann	Förderkennzeichen: 22023511 bzw. 11NR235

Thema:

Charakterisierung des Proteoms unter Stickstoff- und Wassermangelstress als Grundlage für die züchterische Entwicklung stickstoffeffizienter und trockentoleranter Stärkekartoffeln

Teilvorhaben 3: In-vitro-Screening unter Wassermangelstress und Untersuchung der Veränderung des Proteoms

Laufzeit des Vorhabens:
15.11.2012 bis 14.03.2016

Projektbeschreibung: 1701 Zeichen mit Leerzeichen

Durch den prognostizierten Klimawandel werden immer häufiger Trockenperioden im Frühjahr und Frühsommer erwartet. Diese Periode stellt den Zeitraum dar, in dem Kartoffeln ihr größtes vegetatives Wachstum und den höchsten Stickstoffbedarf aufweisen. Um das Risiko von Stickstoffauswaschung ins Grundwasser durch die Zeitlich dicht gedrängte Applikation von Wasser und Stickstoffdünger zu vermeiden, ist es von erheblichem Interesse, Reaktionen der Stärkekartoffeln bezüglich der beiden Stressoren Stickstoff- und Wassermangel zu kennen. Um unkontrollierbare Umweltfaktoren und Pathogene weitestgehend auszuschließen und damit die Möglichkeit der Variation nur eines Stressfaktors zu gewährleisten, sollten die für die Proteomuntersuchungen verwendeten Pflanzen unter *In-vitro*-Bedingungen kultiviert werden. Ein Screening des Stärkekartoffelsets bezüglich der Toleranz hinsichtlich osmotischem Stress, welcher stellvertretend für Trockenstress *in vitro* appliziert wurde, sollte Aufschluss über die Eignung des Testsystems geben. Hierfür wurden Stärkekartoffelgenotypen osmotischem Stress durch die Zugabe von 0,2 M Sorbitol zu einem festen MS-Medium (Murashige und Skoog 1962) ausgesetzt. Die am stärksten divergierenden Genotypen wurden einer Proeteomuntersuchung unterzogen und spezielle Metaboliten wurden untersucht. Mit Hilfe der Metabolitanalyse sollte ebenfalls die Frage geklärt werden, ob Sorbitol, das verwendete Osmotikum, von den Pflanzen in diesem experimentellen Setup aufgenommen wird oder nicht. Auf Basis der identifizierten Proteine mit stressspezifischen Abundanzprofilen sollten physiologische Interpretationen ermöglicht werden, aber ggf. auch eine Biomarkerentwicklung stattfinden.

Projektergebnisse: 2048 Zeichen mit Leerzeichen

Durch die Arbeiten von Gopal und Iwama (2007) und eigenen Versuchen wurde 0,2 M Sorbitol als geeignete Konzentration identifiziert, um Kartoffelgenotypen *in vitro* auf ihre Reaktion bezüglich osmotischem Stress zu differenzieren. Geeignete Parameter für eine Separation bezüglich der Stresstoleranz der einzelnen Genotypen wurden mit dem SSI (Stress susceptibility index, Fischer und Maurer 1978) der Trockenmasse und

[1] Für die Projektbeschreibung und die Projektergebnisse jeweils maximal 2.000 Zeichen. Das Berichtsblatt ist bei Verbundvorhaben für jedes Teilvorhaben separat zu erstellen.

dem Trockenmasseverhältnis zwischen Wurzel und Spross identifiziert. Die Prolinkonzentration innerhalb der Pflanzen stieg unter Stress signifikant an. Die Analyse der Prolinakkumulation nach der Stressbehandlung konnte jedoch nicht mit dem Toleranzlevel der Genotypen korreliert werden. Diese ist in Übereinstimmung mit früheren Ergebnissen aus der Literatur (Schafleitner et al. 2007). Ein Vergleich der Stressreaktion *in vitro* mit den Reaktionen auf Trockenstress in den Topfversuchen unseres Projektpartners des JKI in Groß Lüsewitz ergab, dass die am stärksten kontrastierenden Genotypen auch unter Trockenstress als tolerant bzw. sensitiv eingestuft wurden.

Die beiden divergierend reagierenden Genotypen wurden daraufhin auf ihre Veränderungen im Proteom getestet. Hierfür wurden an Tag 11 nach der Stressapplikation Proben genommen. Deutliche Unterschiede waren nach der Auswertung der IEF/SDS-PAGE Gele zu erkennen. Während im toleranten Genotypen gerade einmal 20 differential abundante Spots detektierbar waren, waren es im sensitiven Genotypen 118. Die Genotypen zeigten Unterschiede in der Antwort bezüglich Proteolyse, Akkumulation spezieller Stressproteine und ROS-detoxifizierenden und -produzierenden Proteinen.

Anhand der Metabolitanalyse konnte gezeigt werden, dass auch hier der sensitive Genotyp deutlich stärkere Veränderungen nach Stressapplikation zeigte als der tolerante Genotyp. Unterschiede in der Metabolitkonzentration waren vor allem für Prolin, Glycin, Phenylalanin und Saccharose zu beobachten. Es konnte gezeigt werden, dass Sorbitol in diesem experimentellen Setup von den Pflanzen aufgenommen wird.

Fischer R.A. and Maurer R. (1978) Drought resistance in spring wheat cultivars. I Grain yield responses. Aust. J. Agron. Res. 29, 897-912.

Gopal J. and Iwama K. (2007) In-vitro screening of potato against water-stress mediated through sorbitol or PEG. Plant Cell Rep, 26,693-700.

Murashige T. and Skoog F. (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant 15, 473-497.

Short Project Description[1]

Beneficiary:	Project number:
Leibniz Universität Hannover; Institut für Gartenbauliche Produktionssysteme; Abteilung Gehölz- und Vermehrungsphysiologie; Prof. Dr. Traud Winkelmann	22023511 bzw. 11NR235

Project title:

Characterisation of the proteome under nitrogen and water deficiency as a basis for the development through breeding of nitrogen efficient and drought tolerant starch potatoes

Sub-project 3: In-vitro-screening under water deficiency and analysis of the changes of the proteome

Project:
15.11.2012 bis 14.03.2016

Project objective: 1604 Characters with blank characters

Through the foretold climate change drought periods will arise more often in spring and early summer. This period represents the time in which potatoes display their biggest vegetative growth and the highest nitrogen demand. To reduce the risk of leaching of nitrogen into the ground water through the application of water and nitrogen fertiliser during a narrow time frame, it is of utmost interest to gain insights into specific responses of starch potatoes to both stressors namely nitrogen or water deficiency. To reduce uncontrollable environmental influences and pathogens and therefore to ensure the possibility of variation to just one stress factor, the plants for the proteomic approach were cultured under *in vitro* conditions. A screening of a set of starch potatoes for their tolerance to osmotic stress, which was applied substitutional for drought stress, should give information about the suitability as a test system. For this purpose, starch potato genotypes were subjected to osmotic stress *in vitro* through the addition of 0.2 M sorbitol to a solid MS-medium (Murashige and Skoog 1962). The most divergently responding genotypes were used for a proteomic comparison and special metabolites were analysed. Also with help of the metabolite analysis the question should be answered if sorbitol, the osmoticum of choice, would be taken up by the plants in this experimental setup or if this would not be the case. On basis of the identified proteins with stress specific abundancy profiles, physiological interpretations should be enabled, but also possible biomarkers should be developed.

Project results: 1936 Characters with blank characters

Through the work of Gopal and Iwama (2007) and own experiments 0.2 M sorbitol was identified as a suitable concentration to differentiate potato genotypes *in vitro* for their response to osmotic stress. Suitable parameters for separation concerning the stress tolerance of the individual genotypes were identified as the SSI (stress susceptibility index, Fischer und Maurer 1978) of the dry mass and the dry mass ratio between the root and the shoot. The proline concentration within the plants rose significantly after stress. However, the proline accumulation after the stress treatment could not be correlated to the tolerance level of each genotype. This is in accordance with earlier results from literature (Schafleitner et al. 2007). A comparison of the stress responses *in vitro* with the responses on drought stress in pot trials of our project partner of the JKI in Groß Lüsewitz displayed, that the most divergently responding genotypes were also classified as tolerant or sensitive under drought stress. Both divergently responding genotypes were subsequently analysed for their

changes in the proteome. For this purpose, samples were taken on day 11 after stress application. Distinct differences were visible after the evaluation of the IEF/SDS-PAGE gels. While in the tolerant genotype only 20 differential abundant spots were detectable, the sensitive genotypes displayed 118. The genotypes exhibited differences in their answer to proteolysis, accumulation of specific stress proteins and ROS-detoxification and –producing enzymes.

On the basis of the metabolite analysis it was shown, that the sensitive genotype also displayed higher alteration after stress application compared to the tolerant genotype on this level. Differences in metabolite concentration were mainly observed for proline, glycine, phenylalanine and sucrose. It could be shown that sorbitol was taken up by the plants in this experimental setup.

Fischer R.A. and Maurer R. (1978) Drought resistance in spring wheat cultivars. I Grain yield responses. Aust. J. Agron. Res. 29, 897-912.

Gopal J. and Iwama K. (2007) In-vitro screening of potato against water-stress mediated through sorbitol or PEG. Plant Cell Rep, 26,693-700.

Murashige T. and Skoog F. (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant 15, 473-497.

Schlussbericht

I. Ziele

Kurze Darstellung

Ziel der vorliegenden Arbeit war eine Untersuchung der Antwort von Stärkekartoffeln auf osmotischen Stress *in vitro* mit speziellem Fokus auf die frühen Änderungen im Proteom. Identifizierte Proteine könnten in einem nächsten Schritt zur schnellen Analyse von genotypischen Unterschieden in der Reaktion auf Wassermangelstress genutzt werden und als Biomarker fungieren.

1. Aufgabenstellung

- *das wissenschaftlich-technische Ergebnis des Vorhabens, die erreichten Nebenergebnisse und die gesammelten wesentlichen Erfahrungen, Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde*
- *Planung und Ablauf des Vorhabens*

Gegenstand des Projektes war die Entwicklung und Optimierung von Methoden zur Bestimmung der Toleranz gegenüber Trockenstress zur Erfassung von Toleranzreaktionen. Es sollten Versuche zur Erfassung von Toleranzeigenschaften verschiedener Genotypen sowohl unter kontrollierten Bedingungen *in vitro* als auch im Rainout-Shelter am JKI in Groß Lüsewitz (Teilprojekt 1) untersucht werden (Teilprojekt 1 ist nicht Gegenstand dieses Berichtes). Die Analysen sollten zeigen, ob die Stresstoleranz bestimmende Komponenten auch unter praxisfernen Bedingungen sicher erfasst werden können. Dazu sollten Stressindices einer Reihe verschiedener Stärkekartoffelgenotypen bestimmt und die Ergebnisse aus Containerversuchen im Rainout-Shelter sowie aus *In-vitro*-Untersuchungen validiert werden, um Eignung und Potential der Methoden für die Markerentwicklung abzuschätzen.

Hierfür wurde ein *In-vitro*-Testsystem etabliert, um geeignete Parameter zu identifizieren, welche eine Einordnung der zu testenden Genotypen in Toleranzkategorien erlauben. Zwei divergent reagierende Genotypen wurden daraufhin auf die Veränderungen im Proteom und in speziellen Metaboliten getestet.

Siehe auch Merkblatt zum Schlussbericht

2. Stand der Technik

- *wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde, insbesondere Angabe bekannter Konstruktionen, Verfahren und Schutzrechte, die für die Durchführung des Vorhabens benutzt wurden*
- *Angabe der verwendeten Fachliteratur sowie der benutzten Informations- und Dokumentationsdienste*

Durch die Arbeit von Gopal und Iwama (2007) wurde gezeigt, dass das *In-vitro*-System für Kartoffeln ein geeignetes Instrument darstellt, um Genotypen osmotischem Stress auszusetzen. Hierbei wurden die Osmotika Sorbitol und PEG (Polyethylenglycol) in einem Festmedium verglichen und festgehalten, dass 0,2 M Sorbitol die geeignetste Variante zur Applikation von osmotischem Stress für Kartoffeln darstellte. Ein vergleichbares Experiment (mit Sorbitolkonzentrationen von 0,1; 0,2; 0,3 und 0,4 M) wurde am Anfang des Projektes ebenfalls unter den hiesigen Laborbedingungen durchgeführt. Ähnliche Ergebnisse konnten erzielt werden. Das Projekt wurde daher mit 0,2 M Sorbitol in einem festen MS Medium (Murashige und Skoog 1962) durchgeführt.

Benutzte Dienste und Software zur Analyse des Proteoms und der Metaboliten:

- R software (R version 3.1.2; The R Project for Statistical Computing, Lyon, France (www.r-project.org)
- Delta2D software 4.4 (Decodon,Greifswald, Germany)
- MASCOT search algorithm (www.matrixscience.com, MASCOT version 2.5.1)
- ProteinLynx Global Server 2.5.3 (Waters Corporation, Eschborn, Germany)
- Potato protein database; the database contained sequences from *S. tuberosum* group Phureja DM1-3 (http://solanaceae.plantbiology.msu.edu/pgsc_download.shtml)
- KEGG PATHWAY Database (http://www.genome.jp/kegg/pathway.html)
- LECO® ChromaTOF®software optimized for Pegasus HT (Leco, St. Joseph, MI, USA)
- TAGFINDER software (Luedemann *et al.* 2008)

Fachliteratur für den vorliegenden Abschlussbericht:

Fischer R.A. and Maurer R. (1978) Drought resistance in spring wheat cultivars. I Grain yield responses. Aust. J. Agron. Res. 29, 897-912.

Gopal J. and Iwama K. (2007) In-vitro screening of potato against water-stress mediated through sorbitol or PEG. Plant Cell Rep, 26,693-700.

Hothorn T., Bretz F. and Westfall P. (2008) Simultaneous Inference in General Parametric Models. Biometrical J. 50(3), 346-363.

Luedemann A., Strassburg K., Erban A., Kopka J. (2008) TagFinder for the quantitative analysis of gas chromatography and mass spectrometry (GC-MS)-based metabolite profiling experiments. Bioinformatics 24, 732–737.

Murashige T. and Skoog F. (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant 15, 473-497.

Potato Genome Sequencing Consortium (2011) Genome sequence and analysis of the tuber crop potato. Nature 475, 189–195.

3. Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Dieser Teil des PROKAR-Projektes ist in Kooperation mit den zugehörigen Projektpartnern entstanden. *In-vitro*-Pflanzenmaterial wurde über das JKI Groß Lüsewitz von den Kartoffelzüchtern und der IPK Kartoffelgenbank Groß Lüsewitz bereitgestellt. Proteomanalysen wurden in Kooperation mit dem IPK Gatersleben und der AG Braun des Instituts für Pflanzengenetik der Leibniz Universität Hannover durchgeführt. Metabolitanalysen erfolgten an der Leibniz Universität Hannover am Institut für Botanik AG Peterhänsel. Die Zusammenarbeit mit allen Partnern war hervorragend.

II. Ergebnisse

Eingehende Darstellung

1. Erzielte Ergebnisse

- *das wissenschaftlich-technische Ergebnis des Vorhabens*
- *die erreichten Nebenergebnisse*
- *die gesammelten wesentlichen Erfahrungen*

Arbeitspaket 3: In-vitro-Screening unter Wassermangelstress und Untersuchung der Veränderung des Proteoms

Hauptziel dieses Arbeitspakets war es Stärkekartoffeln in Hinblick auf ihre Toleranz *in vitro* einzusortieren und von divergent reagierenden Genotypen einen Einblick in die Veränderungen des Proteoms zu erhalten.

Kartoffeln (*Solanum tuberosum* L.) zählen weltweit zu den wichtigsten landwirtschaftlichen Kulturen neben Mais, Reis und Weizen. Da Kartoffeln jedoch relativ anfällig gegenüber Trockenheit sind, ist es von unschätzbarem Interesse neue Genotypen schnell und effektiv auf

ihre Toleranz auf Trockenheit zu selektieren. Insbesondere Stärkekartoffeln sind betroffen, da diese ihre Stärkeeinlagerungen bei Trockenheit abbauen, um Energie in Form von Zucker zu gewinnen.

In-vitro-Selektionssystem

Von den jeweiligen Züchtern wurden über den Kooperationspartner (Frau Dr. Schum, Julius-Kühn-Institut, Institut für Resistenzforschung und Stresstoleranz, JKI), der die *In-vitro*-Etablierung vorgenommen hatte, *In-vitro*-Sprosskulturen der Genotypenauswahl für das PROKAR-Projekt zur Verfügung gestellt (siehe Tab. 1). Diese wurden erfolgreich vermehrt und standen somit für die nachfolgend beschriebenen Analysen in ausreichender Anzahl zur Verfügung.

Teilziel dieses Arbeitspakets war es, Genotypen bereits *in vitro* zu identifizieren, die tolerant gegenüber Wassermangel sind. Ein erster Schritt zum Erreichen dieses Ziels lag darin, ein *In-vitro*-Selektionssystem zu etablieren. Ausgehend von Berichten in der Literatur (Gopal und Iwama 2007) und vorangegangenen eigenen Versuchen (siehe Zwischenbericht Nr.1, 2 und 3) wurden alle Stärkekartoffelgenotypen, zwei Referenz-Speisekartoffelgenotypen und zwei Wildarten (*S. tarijense* und *S. chacoense*) auf ihre Reaktion auf den Zusatz von 0,2 M Sorbitol im Festmedium und den dadurch applizierten osmotischen Stress getestet. Die Wildarten wurden von Herrn Dehmer (IPK Kartoffelgenbank, Groß Lüsewitz) zur Verfügung gestellt. Bewertet wurden jeweils 10 Becher á 5 Pflanzen an Tag 21 nach dem Umsetzen der Sprossspitzen auf Medium mit und ohne Sorbitol-Zusatz in zwei Wiederholungen des Experiments. Hierbei wurden die Frisch- und Trockenmasse von Spross und Wurzel dokumentiert. Die Kulturen wurden unter konstanten Bedingungen angezogen (18 °C und ca. 35 µmol m^{-2} s^{-1}, 16 h Licht/ 8 h Dunkelheit). In diesem Projekt wurden 18 Kartoffelgenotypen und zwei Wildarten auf ihre Reaktion auf osmotischen Stress *in vitro* durch die Zugabe von 0,2M Sorbitol getestet. In der ersten Hälfte des Projektes schied der Genotyp Desiree aus, da dieser endophytische Bakterien aufwies die das Wachstum beeinfluss haben.

Nach 21 Tagen auf dem Versuchsmedium (MS-Medium mit oder ohne Sorbitol, Murashige und Skoog 1962) wurde eine optisch sehr deutliche Reduktion des Wachstums in beiden Wiederholungen festgestellt (Abb.1). Hierbei fielen vor allem die Genotypen Maxi und Eurobravo unter osmotischem Stress *in vitro* auf.

Tabelle 1: Genotypenauswahl des PROKAR-Projektes. Genotyp 1 (cv. Desiree) schied im Laufe des Projektes auf Grund des Auftretens von endophytischen Bakterien aus.

Genotype	Genotype	year of registration	Maturation time	Tuber yield	Starch yield	Varity	Breeder
2	cv. Eurobravo	2006	mid late-late	high	high	Starch	Europlant Pflanzenzucht GmbH; Lüneburg
3	cv. Euroflora		late	high	medium	Starch	Europlant Pflanzenzucht GmbH; Lüneburg
4	cv. Euronova		mid late	very high	high	Starch	Europlant Pflanzenzucht GmbH; Lüneburg
5	cv. Euroresa	2010	very early	very high	high	Starch	Europlant Pflanzenzucht GmbH; Lüneburg
6	cv. Eurostarch	2005	mid late	high	high	Starch	Europlant Pflanzenzucht GmbH; Lüneburg
7	cv. Heidrun	1987	late	high		Starch	Saatzucht Fritz Lange; Bad Schwartau
8	cv. Jasia		mid late	high	very high	Starch	Dr. K. H. Niehoff, Bütow
9	cv. Kiebitz	2009	mid early-early		medium	Starch	NORIKA.Kartoffelzucht GmbH, Sanitz
10	cv. Kolibri	1998	early	medium	high	Starch	NORIKA.Kartoffelzucht GmbH, Sanitz
11	cv. Kormoran	2003	mid late-late	high	high	Starch	NORIKA.Kartoffelzucht GmbH, Sanitz
12	cv. Lambada	2003	mid early	high		Table	NORIKA.Kartoffelzucht GmbH, Sanitz
13	cv. Maxi	2004	mid late-late	high	high to very high	Starch	Bayerische Pflanzenzuchtgesellschaft eG &Co KG, Freising
14	cv. Priamos	2002	mid early	high	high	Starch	SaKa Pflanzenzucht GmbH & Co KG; Hamburg
15	cv. Ramses	2004	mid early	medium to high	very high	Starch	SaKa Pflanzenzucht GmbH & Co KG; Hamburg
16	cv. Sibu	1993	mid late-late	high	high to very high	Starch	SaKa Pflanzenzucht GmbH & Co KG; Hamburg
17	cv. Tomba	1995	late	medium	high	Starch	Europlant Pflanzenzucht GmbH; Lüneburg
18	cv. Topas	2005	medium	high		Table	Europlant Pflanzenzucht GmbH; Lüneburg
19	cv. Verdi	2003	medium	medium	high	Starch	SaKa Pflanzenzucht GmbH & Co KG; Hamburg

Eine Reduktion der Spross und Wurzel Frisch- sowie Trockenmasse wurde für alle Genotypen beobachtet (Tab. 2 und 3). Besser wachsende Genotypen wie z.B. cv. Euroflora (29,0 % Reduktion der Sprosstrockenmasse) oder die Wildart *S. chacoense* (30,1 % Reduktion der Sprosstrockenmasse) waren nicht zwangsläufig unter den Genotypen mit der höchsten Trockenmassereduktion. Die höchste Reduktion der Trockenmasse nach Stressbehandlung mit 0,2 M Sorbitol wurde für cv. Eurobravo, cv. Ramses und die Wildart *S. tarijense* mit einer Reduktion der Sprosstrockenmasse von jeweils 41,2 %, 43,8 % und 40,6 % festgestellt. Die geringste Reduktion in der Sprosstrockenmasse konnte für cv. Maxi und cv. Verdi mit jeweils 12,2 % und 21,1 % beobachtet werden (Tab. 2).

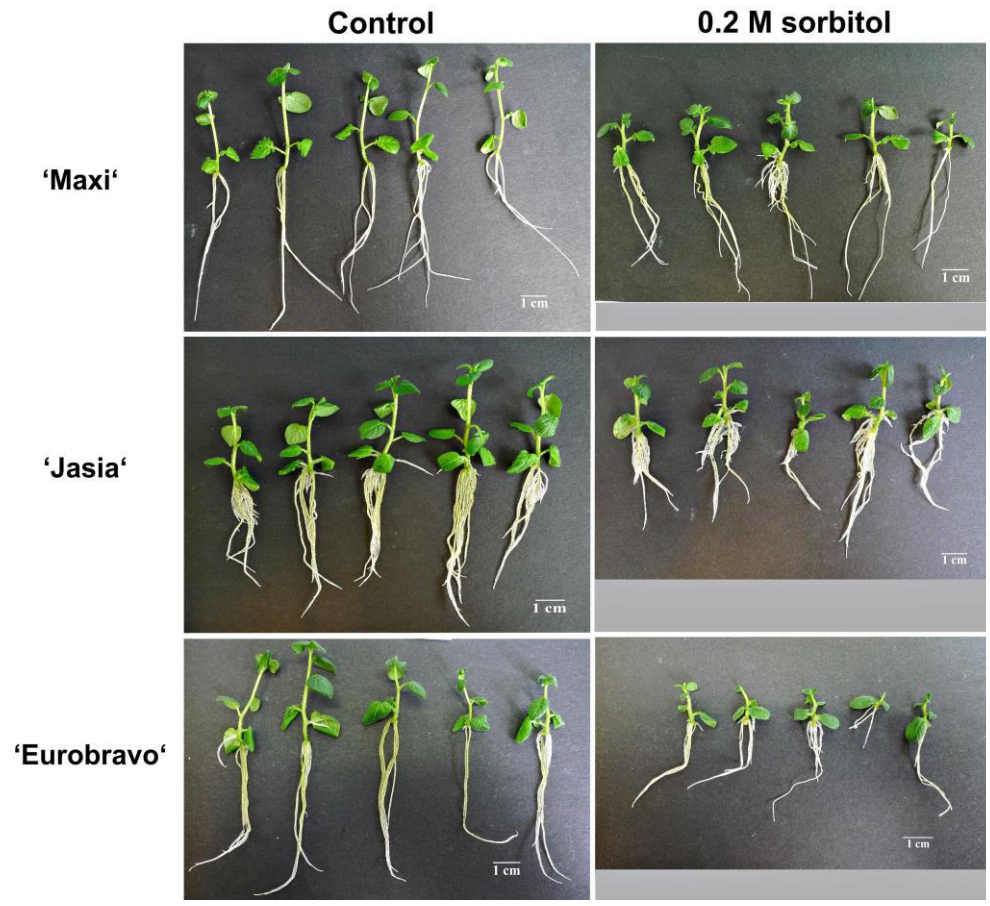


Abbildung 1: Überblick über drei kontrastierende Genotypen nach 21 Tagen auf Kontroll- bzw. Stressmedium mit 0,2 M Sorbitol.

Balken entsprechen 1 cm.

Die höchste Reduktion der Wurzelfrischmasse zeigten cv. Eurobravo, cv. Ramses und cv. Tomba (83,3 %, 71,9 % und 66,7 %) (Tab. 2). Die geringste Reduktion wurde für cv. Maxi, cv. Eurostarch und cv. Euroflora mit jeweils 25,0 %, 26,5 % und 28,9 % dokumentiert. Die Reduktion in der Wurzeltrockenmasse war am höchsten für cv. Eurobravo, cv. Ramses und *S. tarijense* (jeweils 68,4 %, 55,6 % und 50,0 %). Ein leichter Anstieg der Wurzeltrockenmasse konnte hingegen für cv. Maxi (+ 7,7 %) und für cv. Eurostarch (+ 6,7 %) gezeigt werden, wohingegen cv. Euroflora keinen Anstieg oder Verlust aufwies (+/- 0 %).

Tabelle 2: Frisch- und Trockenmasse des Sprosses an Tag 21 auf Medium mit und ohne 0,2 M Sorbitol. n= 20; CLD = compact letter display, verschiedene Buchstaben zwischen den Genotypen stehen für signifikante Unterschiede auf einem globalen Signifikanzniveau von 5 %, CLD wurde für die log transformierten Daten berechnet. % red = % Reduktion nach Behandlung mit 0,2 M Sorbitol im Vergleich zur Kontrolle.

Genotype	FM shoot Control [mg]	Stdw +/-	CLD	FM shoot 0.2 M sorbitol	Stdw +/-	CLD	% red.	DM shoot Control [mg]	Stdw +/-	CLD	DM shoot 0.2 M sorbitol	Stdw +/-	CLD	% red.
Genotype 2	0.370	0.082	fghi	0.131	0.030	fh	64.6	0.034	0.007	cdf	0.020	0.004	cfg	41.2
Genotype 3	0.756	0.106	a	0.320	0.055	a	57.7	0.062	0.008	ab	0.044	0.008	ab	29.0
Genotype 4	0.531	0.105	bcde	0.187	0.039	bcde	64.8	0.039	0.011	cdef	0.024	0.005	cdefg	38.5
Genotype 5	0.333	0.086	fg	0.146	0.040	bfgh	56.2	0.028	0.007	cg	0.019	0.005	cfh	32.1
Genotype 6	0.491	0.121	bcdh	0.220	0.073	cdij	55.2	0.038	0.007	cdef	0.028	0.009	deij	26.3
Genotype 7	0.492	0.075	bcd	0.229	0.043	dij	53.5	0.042	0.006	deh	0.031	0.005	dij	26.2
Genotype 8	0.547	0.126	bde	0.259	0.044	aij	52.7	0.048	0.010	aeh	0.034	0.006	dij	29.2
Genotype 9	0.425	0.057	bcfhi	0.189	0.025	cde	55.5	0.038	0.005	def	0.027	0.003	deij	28.9
Genotype 10	0.419	0.045	bcfhi	0.176	0.024	bcde	58.0	0.035	0.004	cdef	0.025	0.004	defg	28.6
Genotype 11	0.454	0.050	bcdhi	0.209	0.036	cdeij	54.0	0.037	0.003	cdef	0.027	0.005	deij	27.0
Genotype 12	0.584	0.120	ade	0.262	0.053	aij	55.1	0.039	0.006	def	0.030	0.006	dij	23.1
Genotype 13	0.519	0.145	bcd	0.277	0.070	ai	46.6	0.041	0.010	defh	0.036	0.008	aij	12.2
Genotype 14	0.680	0.128	ae	0.263	0.043	ai	61.3	0.054	0.009	ah	0.036	0.006	ai	33.3
Genotype 15	0.361	0.039	fghi	0.131	0.017	fgh	63.7	0.032	0.003	cdf	0.018	0.002	ch	43.8
Genotype 16	0.408	0.100	cfhi	0.179	0.054	bcdeg	56.1	0.036	0.008	cdef	0.024	0.006	cdefg	33.3
Genotype 17	0.363	0.099	fgi	0.161	0.047	befg	55.6	0.030	0.007	cfg	0.022	0.008	cefg	26.7
Genotype 18	0.288	0.080	g	0.111	0.030	h	61.5	0.023	0.005	g	0.014	0.003	h	39.1
Genotype 19	0.412	0.077	bcfhi	0.197	0.039	cdij	52.2	0.033	0.006	cdf	0.026	0.006	degj	21.2
S. chacoense	1.287	0.218	j	0.511	0.111	k	60.3	0.083	0.013	b	0.058	0.013	b	30.1
S. tarijense	0.439	0.108	bcfhi	0.163	0.035	bcefg	62.9	0.032	0.008	cdfg	0.019	0.004	cfgh	40.6

Tabelle 3: Frisch- und Trockenmasse der Wurzeln nach 21 Tagen auf Medium mit und ohne 0,2 M Sorbitol. n= 20; CLD = compact letter display, verschiedene Buchstaben zwischen den Genotypen stehen für signifikante Unterschiede auf einem globalen Signifikanzniveau von 5 %, CLD wurde für die log transformierten Daten berechnet. % red = % Reduktion nach Behandlung mit 0,2 M Sorbitol im Vergleich zur Kontrolle.

Genotype	FM root Control [mg]	Stdw +/-	CLD	FM root 0.2 M Sorbitol [mg]	Stdw +/-	CLD	% red.	DM root Control [mg]	Stdw +/-	CLD	DM root 0.2 M Sorbitol [mg]	Stdw +/-	CLD	% red.
Genotype 2	0.264	0.062	ach	0.044	0.024	ach	83.3	0.019	0.003	abef	0.006	0.003	fg	68.4
Genotype 3	0.315	0.060	ab	0.224	0.044	ab	28.9	0.023	0.004	abc	0.023	0.004	ab	0.0
Genotype 4	0.196	0.037	cdef	0.111	0.025	cdef	43.4	0.015	0.003	defg	0.012	0.003	cd	20.0
Genotype 5	0.146	0.045	dg	0.059	0.024	dg	59.6	0.011	0.003	d	0.006	0.002	efg	45.5
Genotype 6	0.212	0.044	cefh	0.156	0.044	cefh	26.4	0.015	0.003	defg	0.016	0.004	chi	-6.7
Genotype 7	0.297	0.047	abh	0.152	0.032	abh	48.8	0.021	0.003	abe	0.016	0.003	chi	23.8
Genotype 8	0.469	0.121	i	0.237	0.048	i	49.5	0.033	0.007	c	0.024	0.004	a	27.3
Genotype 9	0.263	0.043	ach	0.103	0.014	sch	60.8	0.019	0.003	abe	0.011	0.002	cd	42.1
Genotype 10	0.318	0.058	abi	0.196	0.032	abi	38.4	0.022	0.003	abc	0.021	0.003	abh	4.5
Genotype 11	0.293	0.040	abh	0.155	0.043	abh	47.1	0.020	0.005	abef	0.017	0.005	bchi	15.0
Genotype 12	0.353	0.098	abi	0.178	0.060	abi	49.6	0.025	0.005	abc	0.018	0.005	abhi	28.0
Genotype 13	0.176	0.026	defg	0.132	0.021	defg	25.0	0.013	0.002	dfg	0.014	0.002	ci	-7.7
Genotype 14	0.407	0.074	bi	0.167	0.044	bi	59.0	0.027	0.005	bc	0.017	0.004	abhi	37.0
Genotype 15	0.256	0.070	aceh	0.072	0.017	aceh	71.9	0.018	0.004	aefg	0.008	0.002	dej	55.6
Genotype 16	0.195	0.048	cdef	0.085	0.030	cdef	56.4	0.015	0.003	defg	0.009	0.004	defj	40.0
Genotype 17	0.156	0.055	dfg	0.052	0.028	dfg	66.7	0.011	0.003	d	0.006	0.003	g	45.5
Genotype 18	0.176	0.058	dfg	0.082	0.034	dfg	53.4	0.012	0.003	dg	0.008	0.003	efj	33.3
Genotype 19	0.130	0.025	g	0.080	0.021	g	38.5	0.012	0.002	d	0.009	0.002	dj	25.0
S. chacoense	0.299	0.050	abh	0.134	0.036	abh	55.2	0.023	0.003	abc	0.016	0.004	chi	30.4
S. tarijense	0.061	0.015	j	0.029	0.009	j	52.5	0.006	0.001	h	0.003	0.001	k	50.0

Um eine Einordung der Genotypen hinsichtlich ihrer Reaktion auf Wassermangel vornehmen zu können, gibt es mehrere Möglichkeiten. Für dieses Projekt wurde der Stress Susceptibility Index (SSI) nach Fischer und Maurer (1987) in Absprache mit den Projektpartnern am JKI gewählt.

Der SSI errechnet sich wie folgt:

$$SSI = \frac{(1 - DMs/DMc)}{(1 - meanDMs/meanDMc)}$$

DMs = Trockenmasse Behandlung

DMc = Trockenmasse Kontrolle

meanDMs = Mittelwert Trockenmasse Behandlung über alle Genotypen

meanDMc = Mittelwert der Trockenmasse Kontrolle über alle Genotypen

In Abbildung 2 sind die SSIs für die Trockenmasse der Sprosse und Wurzeln aufgeführt. Hierbei zeigte sich, dass die Genotypen cv. Maxi und cv. Eurostarch zu den toleranteren Genotypen gegenüber osmotischem Stress zählten, wohingegen cv. Ramses, cv. Eurobravo und der Wildtyp *S. tarijense* als sensitiv eingeordnet wurden. Da der Genotyp cv. Ramses nicht im Set von Groß Lüsewitz in den Rainout-Shelter aufgenommen werden konnte, wurde cv. Eurobravo als sensitiver Genotyp für weitere *In-vitro*-Experimente gewählt.

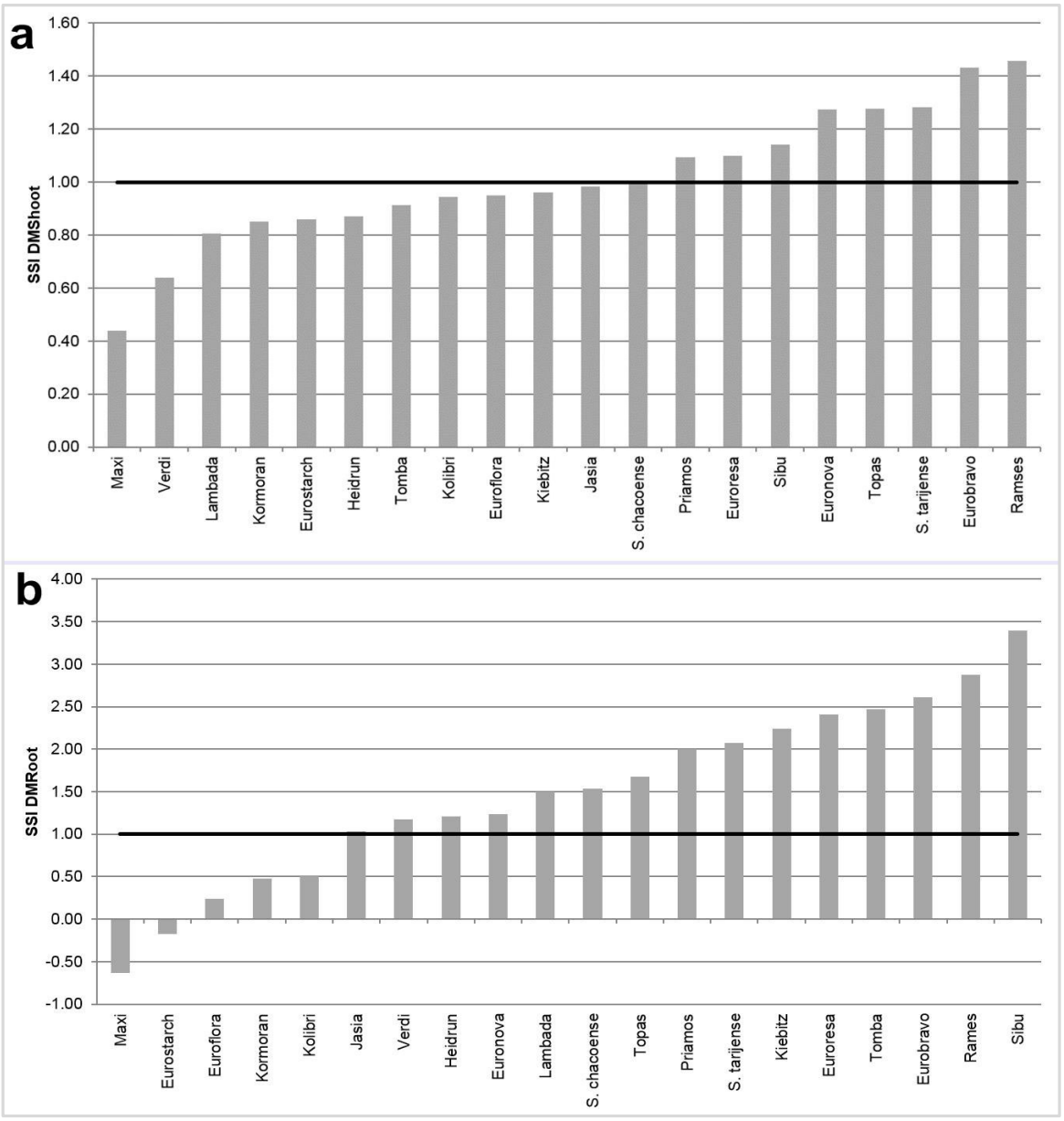


Abbildung 2: Stress susceptibility index (SSI) der Wurzel- und Spross- Trockenmasse nach 21 Tagen.

a SSI der Sprosstrockenmasse nach 21 Tagen auf Versuchsmedium, **b** SSI der Wurzeltrockenmasse nach 21 Tagen auf Versuchsmedium. Schwarze Linie zeigt 1 an. Genotypen mit einem SSI über 1 sind sensitiver gegenüber dem applizierten Stress und unter 1 sind diese toleranter in Bezug auf den applizierten Stress. DM = Trockenmasse

Eine Reduktion des Sprosswachstums und ein erhöhtes Wurzelwachstum wurden in der Literatur als Stressreaktion auf Wassermangelstress beschrieben. Diese wurde als positiv in Bezug auf Verhinderung von Wasserverlust durch die Blattfläche und erhöhte Wasseraufnahme durch die Wurzel begründet. Dieses Verhalten zeigte sich auch bei den

toleranteren Genotypen (Abb. 3). Hierbei zeigten cv. Maxi und cv. Eurostarch eine signifikante Verschiebung zum Wurzelwachstum, wohingegen die sensitiveren Genotypen cv. Eurobravo und cv. Ramses eine signifikante Reduktion des Wurzelwachstums zeigten. Der SSI der Gesamttrockenmasse zusammen mit dem Verhältnis Wurzel/Sprosstrockenmasse wurden daher als geeignete Parameter für die Einordnung der Genotypen innerhalb eines Sets identifiziert.

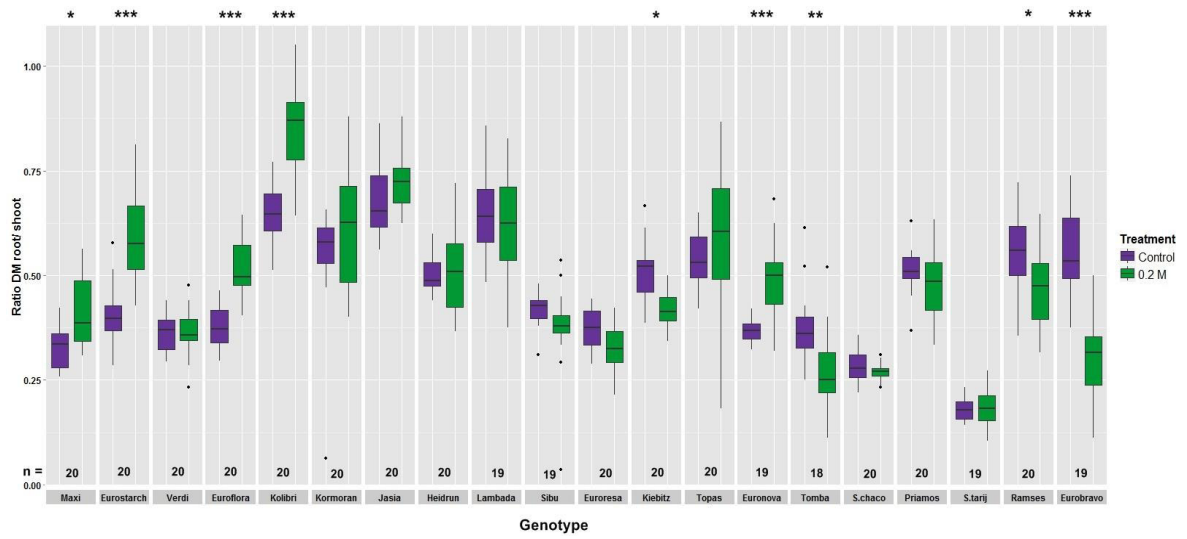


Abbildung 3: Verhältnis Wurzeltrockenmasse zu Sprosstrockenmasse nach 21 Tagen auf Medium ohne bzw. mit 0,2 M Sorbitol.

S.chaco = *S. chacoense*, S.tari = *S. tarijense.* *** = $p < 0.001$; ** = $p < 0.01$; * = $p < 0.05$. Multiple comparison of means, nach Hothorn et al. (2008). Genotypen sind nach ihrem SSI über alle Parameter (Frisch- und Trockenmasse) geordnet. Die tolerantesten Genotypen befinden sich links, die sensitiveren auf der rechten Seite. DM = Trockenmasse

Zusätzlich wurde die Osmolarität des Zellsafts der Sprossspitzen gemessen. Diese wurde dann in das osmotische Potential umgewandelt

$$Osmotisches\ Potential\ [MPa] = (-c * R * T) * 10^{-6}$$

c = gemessene Konzentration [mmol/kg]

R = Gaskonstante in J/mol*K

T = Temperatur in Kelvin

Das osmotische Potential der Sprossspitzen wurde untersucht, um zu prüfen, ob eine unterschiedliche Anpassung des Potentials in den divergierenden Genotypen für die unterschiedliche Stressreaktion in Bezug auf das Wachstum ausschlaggebend ist. Hierbei wurde der extrahierte Zellsaft von Sprossspitzen mit einem Osmometer gemessen (Abb. 4).

Eine signifikante Erniedrigung wurde in beiden Genotypen nach der Stressapplikation festgestellt. Bei der Messung des osmotischen Potentials des Blattes in den Trockenstressversuchen unter dem Rainout-Shelter wurde ebenfalls eine signifikante Erniedrigung dokumentiert (Abb. 5, Daten freundlicherweise von Meise, Seddig, Schum zur Verfügung gestellt). Diese Erniedrigung war jedoch im toleranten Genotyp verstärkt. Ob dieses auch für andere Genotypen gilt, muss noch überprüft werden.

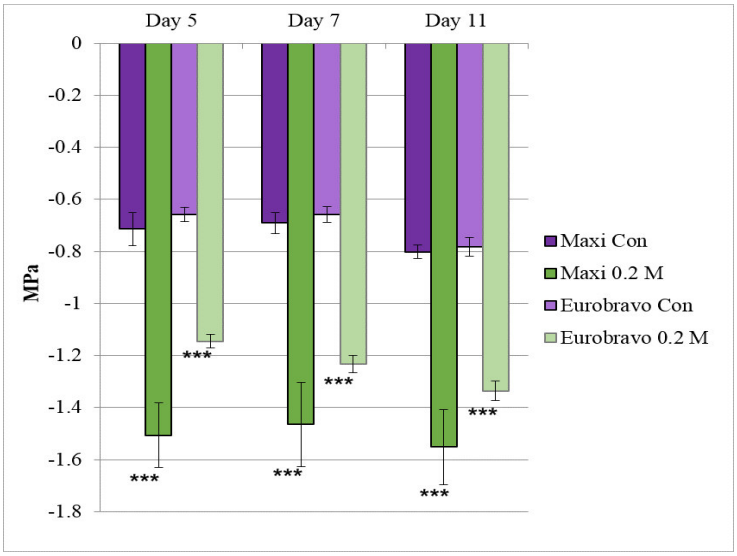


Abbildung 4: Osmotisches Potential der Sprossspitzen nach 5, 7 und 11 Tagen in flüssigem Medium mit und ohne 0,2 M Sorbitol. Alle Genotypen zeigten einen stark signifikanten Unterschied an allen Tagen zwischen Kontrolle und Pflanzen auf 0,2 M Sorbitol ($p<0.001$; ***). n = 6 von zwei Wiederholungen.

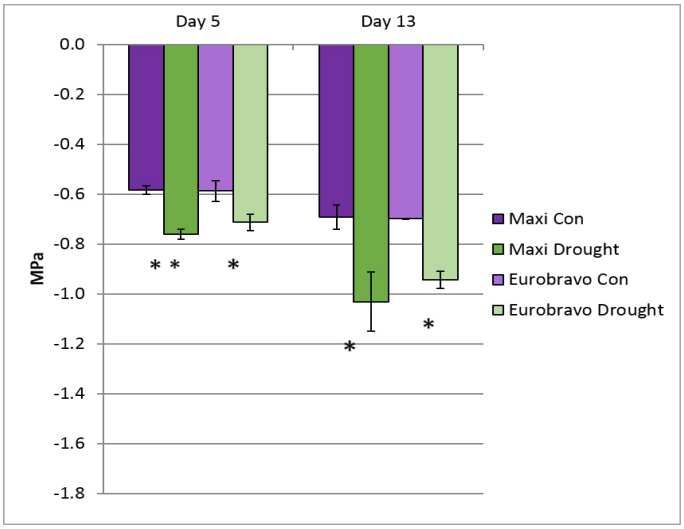


Abbildung 5: Osmotisches Potential des Blattes nach 5 und 13 Tagen nach Trockenstress unter dem Rain-Out-Shelter in Töpfen. Zwei gepoolte Proben von den beiden jüngsten vollentwickelten Blättern von zwei Pflanzen wurden untersucht. Signifikante Unterschied wurden mit Hilfe des Tukey Test berechnet (** = $p<0.01$; * = $p< 0.05$).

Sprossspitzen wurden nach 21 Tagen auf Medium mit und ohne 0,2 M Sorbitol auf ihren Prolingehalt überprüft. Es konnte festgestellt werden, dass Kontrollpflanzen von einigen Genotypen, wie z.B. cv. Kiebitz und cv. Tomba relative hohe Konzentrationen an Prolin aufwiesen (Abb. 6). Diese lagen zwischen 30.0 µmol/g DM für cv. Kiebitz und bei 22.5 µmol/g DM für cv. Tomba. Die Behandlung mit 0,2 M Sorbitol resultierte in einem substantiellen und signifikanten Anstieg in der Prolinkonzentration in allen Genotypen mit Ausnahme von *S. chacoense* (Abb. 6). In allen andern Genotypen stieg der Prolingehalt auf mindestens das 2-Fache gegenüber der Kontrolle nach Stressapplikation. Der höchste Anstieg der Prolinkonzentration im Vergleich zur Kontrolle, wurde in cv. Kolibri, cv. Topas und cv. Lambada beobachtet mit einem bis zu 7-fachen Anstieg. Weil alle Genotypen und eine Wildart ähnliche Reaktionen im Anstieg zeigten, war es nicht möglich diese anhand ihres Prolingehaltes auf ihre Toleranz bezüglich osmotischem Stress zu unterscheiden. Deshalb wurde eine Korrelationsanalyse vorgenommen. Weder der Anstieg im Prolingehalt, noch der Prolingehalt in Kontrollpflanzen oder der Prolingehalt in behandelten Pflanzen konnte mit dem SSI der Sprosstrockenmasse korreliert werden (Tab. 4).

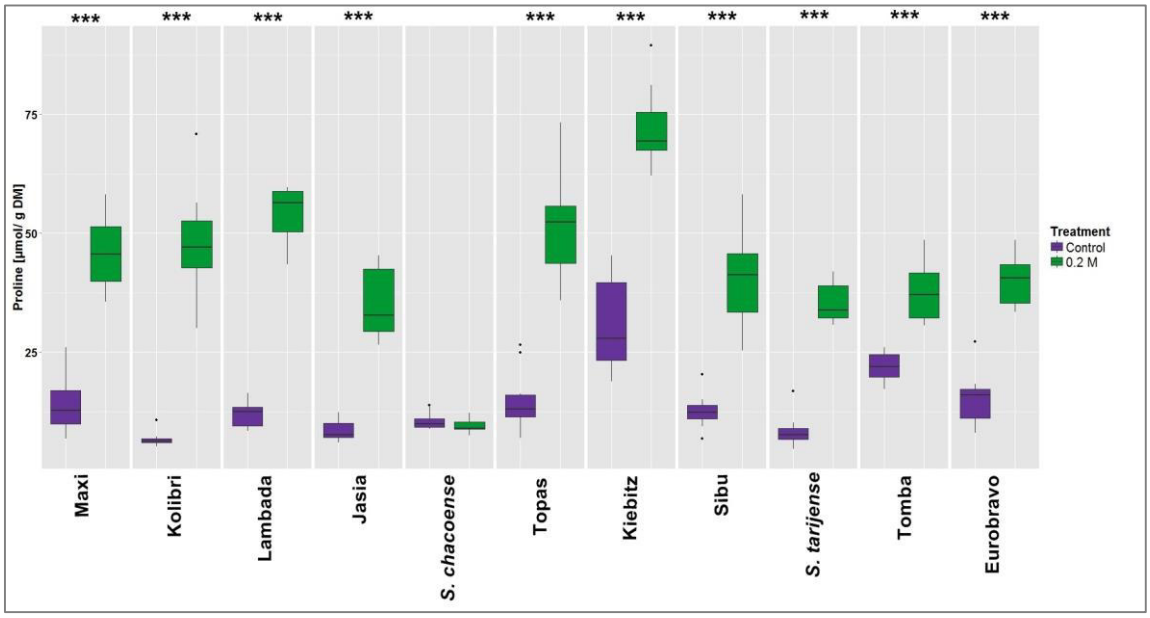


Abbildung 6: Prolingehalt der Sprossspitzen nach 21 Tagen auf Kontroll- oder Versuchsmedium mit 0,2 M Sorbitol. n = 10, cv. Jasia n = 9. *** = p <0.001. Multiple comparison of means, nach Hothorn et al. (2008).

Für den Genotyp cv. Maxi und cv. Eurobravo konnte dieses auch bis dato in den Trockenstressversuchen in Groß Lüsewitz gezeigt werden (Abb. 7). Der Prolingehalt stieg

hier mit zunehmendem Wassermangel deutlich an. Auch *in vitro* konnte diese beobachtet werden (Abb. 8).

Da keine Korrelation zwischen dem Prolingehalt und dem SSI der Sprosstrockenmasse gefunden werden konnte, sollte eine Zeitreihe Aufschluss geben, ob es Unterschiede in der Prolinakkumulation in den beiden kontrastierenden Genotypen cv. Maxi und cv. Eurobravo gab (Abb. 7). In beiden Genotypen stieg die Prolinkonzentration in Kontrollpflanzen bis Tag 7 an, fiel dann auf die Anfangskonzentration an Tag 11 und stieg dann bis Tag 21 erneut leicht an. Behandelte Pflanzen des Genotyps cv. Maxi zeigten einen steilen und rapiden Anstieg in der Prolinkonzentration bis zum Ende des Experimentes eine Konzentration von ca. 100 µmol Prolin/g Trockenmasse erreicht wurde.

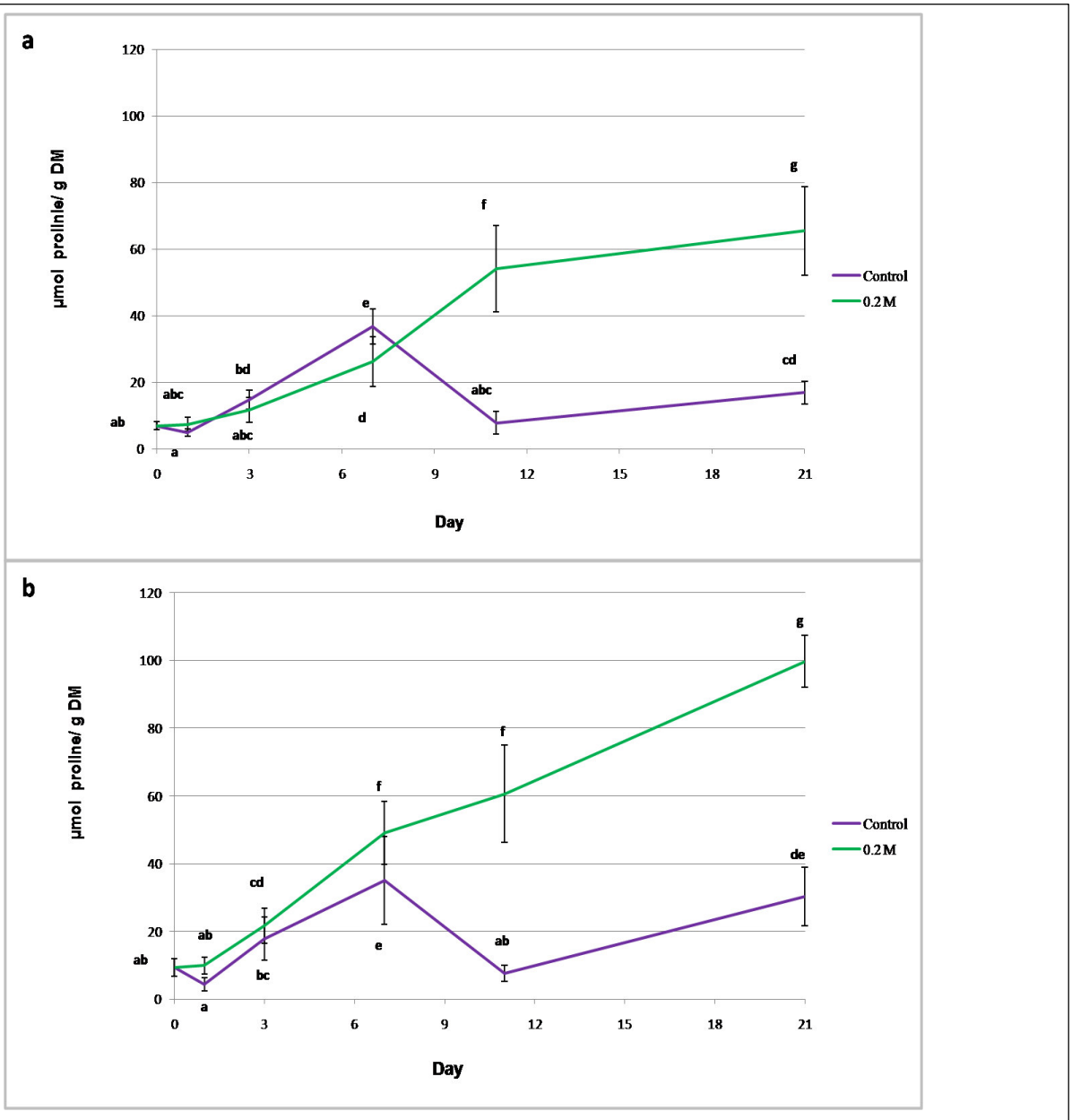


Abbildung 7: Änderungen in der Prolinkonzentration in Sprossspitzen der beiden kontrastierenden Genotypen im Zeitablauf. a cv. Eurobravo, sensitiver Genotyp, **b** cv. Maxi, toleranter Genotyp. Unterschiedliche Buchstaben geben signifikante Unterschiede wieder. Kalkulation mit Hilfe des Tukey Test bei $p \leq 0.05$, Mittelwert ± Standardabweichung, n=10 Becher mit je fünf Pflanzen.

Der Anstieg im Prolingehalt in den mit 0,2 M Sorbitol behandelten Pflanzen war hingegen langsamer für den sensitiven Genotypen cv Eurobravo. Dieser erreichte am Ende des Experiments eine Konzentration von ca. 65 µmol Prolin/ g Trockenmasse. Für beide Genotypen wurde ein signifikanter Unterschied zwischen Kontrolle und Behandlung beginnend mit Tag 11 bis zum Ende des Experiments festgestellt.

Die Prolinkonzentration in Blättern von Trockenstress ausgesetzten Pflanzen aus dem Rain-out-Shelter Versuch wurden an Tag 5 und 13 nach Stressanfang untersucht (Abb. 8). Für beide Genotypen wurde ein Prolingehalt von ca. 1 µmol Prolin/g Trockenmasse an Tag 5 und Tag 13 in den Kontrollpflanzen festgestellt. Trockenstress ausgesetzte Pflanzen von cv. Eurobravo zeigten nach 5 Tagen ca. 17 µmol Prolin/ g Trockenmasse und ca. 130 µmol Prolin/ g Trockenmasse nach 13 Tagen. Der tolerante Genotyp cv. Maxi wies ca. 25 µmol Prolin/ g Trockenmasse an Tag 5 und ca. 140 µmol Prolin/ g Trockenmasse an Tag 13 auf. An den analysierten Zeitpunkten zeigten beide Genotypen ähnlich Prolinkonzentration.

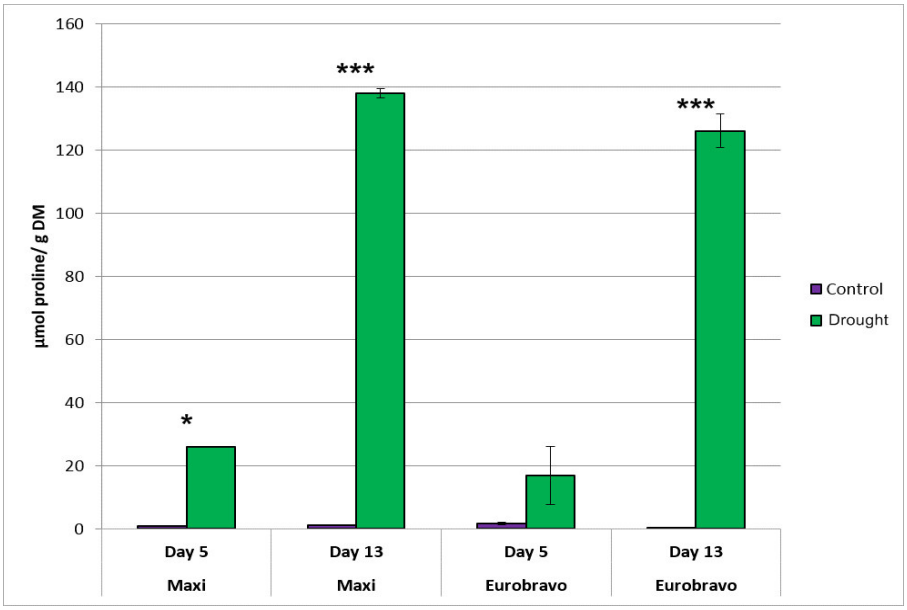


Abbildung 8: Prolingehalt in jungen Blättern 5 und 13 Tage nach Beginn des Trockenstresses in Topfversuchen unter einem Rainout-Shelter. Zwei gepoolte Proben wurden analysiert mit jeweils den beiden jüngsten voll entwickelten Blättern von zwei Pflanzen. Signifikante Unterschiede zwischen Kontrolle und Behandlung wurden berechnet. *** = $p<0.001$; * = $p<0.05$.

Tabelle 4: Korrelation zwischen SSI der Trockenmasse des Sprosses und der Prolinkonzentration von Kontrollpflanzen, behandelten Pflanzen oder dem Verhältnis des Prolingehaltes zwischen Behandlung und Kontrolle.

	R^2	p	Pearson-R
Proline concentration in control vs SSI DM shoot	0.0125	0.74	-0.11
Proline concentration after 0.2 M sorbitol vs SSI DM shoot	0.033	0.59	-0.18
Proline.ratio (0.2 M sorbitol/ control) vs SSI DM shoot	0.0033	0.87	-0.057

Auch eine Korrelation zwischen der Toleranz Einordnung bezüglich der Trockenmasse der Pflanzen im *In-vitro*-Stressversuch und dem Knollenertrag aus den Schelter-Versuchen konnte nicht gezeigt werden. Nur die extrem reagierenden Genotypen Maxi und Eurobravo wurden in gleiche Kategorien eingeordnet. Dies ist wahrscheinlich auf die starken Schwankungen zwischen den Experimenten und den Versuchsjahren der Experimente zurückzuführen.

Schlussfolgernd ist zu erwähnen, dass weder die Prolinkonzentration noch der Anstieg im osmotischen Potential direkt mit der osmotischen Stresstoleranz der Genotypen aus einem Set von 18 Genotypen unter osmotischem Stress *in vitro* korreliert werden konnte. Nichtsdestotrotz stach der tolerante Genotyp Maxi bei beiden Eigenschaften hervor. Nach der Zugabe von 0,2 M Sorbitol zeigten alle Genotypen eine Reduktion in der Frisch- und Trockenmasse. Besonders auffällig war hierbei, dass das Verhältnis von Spross- zu Wurzelmasse sich in den toleranteren Genotypen zugunsten der Wurzelmasse verschob. Der berechnete SSI (Fischer und Maurer 1978) für die Trockenmasse der Pflanzen zusammen mit dem Verhältnis zwischen der Wurzeltrockenmasse und der Sprosstrockenmasse wurden als geeignete Parameter identifiziert, um Genotypen entsprechend ihrer osmotischen Stresstoleranz innerhalb eines Testsets einzuordnen. Der sensitivste und toleranteste Genotyp in dem *in vitro* Stressversuch wurde zumindest ebenfalls in die gleiche Reaktionskategorie unter Trockenstressbedingungen in Topfversuchen des JKI im Rainout-Shelter eingeordnet. Eine Vorselektion des Testsets für ihre Stressreaktion bezüglich osmotischen Stress könnte somit ggf. *in vitro* durchgeführt werden. Ein Ersetzen der Untersuchung von Trockenstressreaktionen in Feldversuchen kann dieses System jedoch nicht leisten. Bis jetzt bleibt ein reproduzierbares Testsystem für den Stressparameter Toleranz gegenüber Trockenheit schwierig, jedoch lassen sich aufgrund der Untersuchungen dieses Projekts Ansätze für eine Weiterentwicklung des Testsystems ableiten, die zu einem späteren Zeitpunkt erläutert werden (s.u.).

Untersuchung des Proteoms von zwei divergent reagierenden Genotypen auf osmotischen Stress *in vitro*

Nachdem im ersten Schritt die Genotypen bezüglich ihrer Toleranz erfolgreich in eine Rangfolge gebracht worden waren, sollten durch die Untersuchung des Proteoms zweier divergierend reagierender Genotypen spezifische Stressantworten auf osmotischen Stress *in vitro* dokumentiert werden. Hierfür wurden die Genotypen Maxi (tolerant) und Eurobravo (sensitiv) gewählt. In Abb. 9 ist der Versuchsaufbau dargestellt. Eine genaue Methodenbeschreibung ist in Bündig et al. (2016) zu finden.

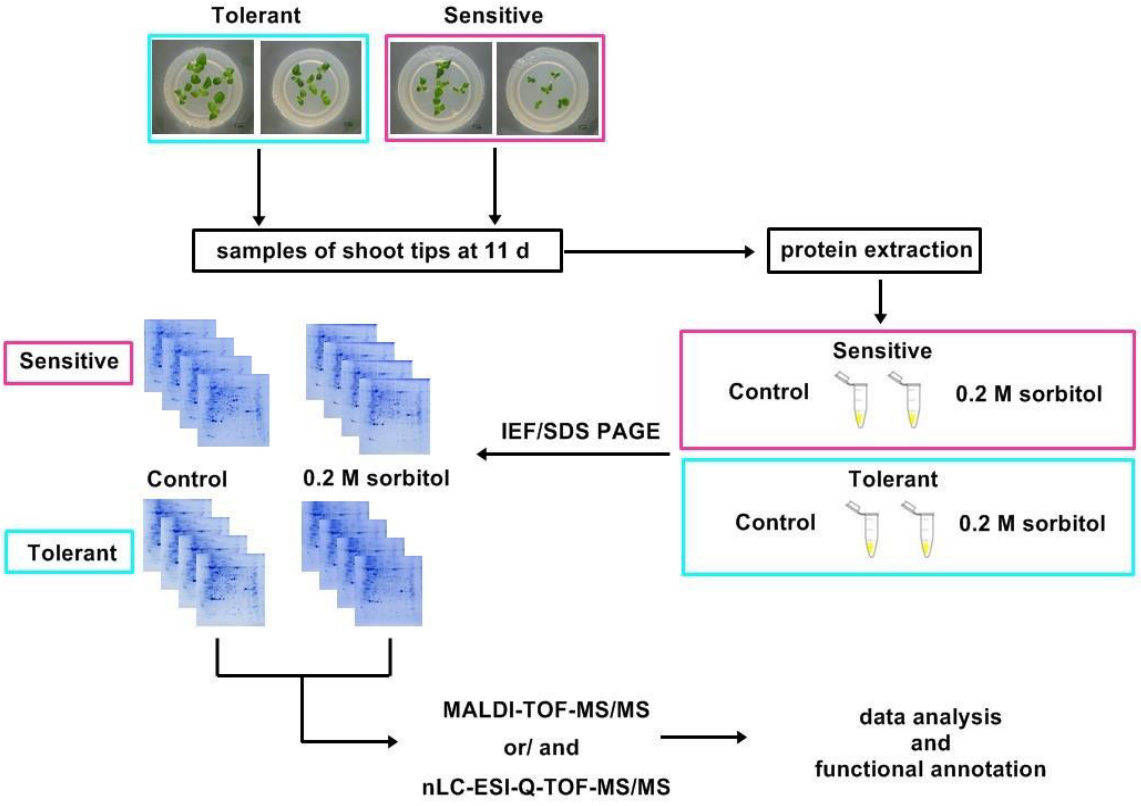


Abbildung 9: Schematischer Überblick über den proteomischen Vergleich der beiden divergierend reagierenden Genotypen *in vitro*. Aus Bündig et al. (2016)

Sprossspitzen der beiden Genotypen wurden 11 Tage nach Beginn des Experiments geerntet und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Eine TCA-Proteinextraktion wurde durchgeführt und pro Genotyp und Behandlung je zwei Gele pro Versuchswiederholung (bestehend aus je 10 Gefäßen mit je 5 Sprossen/Variante) hergestellt. Insgesamt wurden somit vier IEF/SDS-PAGE Gele pro Genotyp und Behandlung angefertigt. Die Gele wurden gescannt und mit Hilfe der Delta2D Software 4.4 (Decodon, Greifswald, Deutschland) ausgewertet. Differenziell abundante Spots mit einem veränderten Spotvolumen von mindestens 1,5 und

einem signifikanten Unterschied nach t-Test (p>0,05) wurden ausgestochen und mit Trypsin behandelt. Die Peptide wurden dann entweder mit der MALDI-TOF-MS/MS ultrafleXtreme ™ (Bruker, Bremen, Deutschland) oder der NanoAcquity LC gekoppelt an das Q-TOF Premiere Massenspektrometer (Waters Corporation, Eschborn, Deutschland) analysiert. Die Daten wurden dann mit Hilfe der Kartoffelgendatenbank identifiziert.

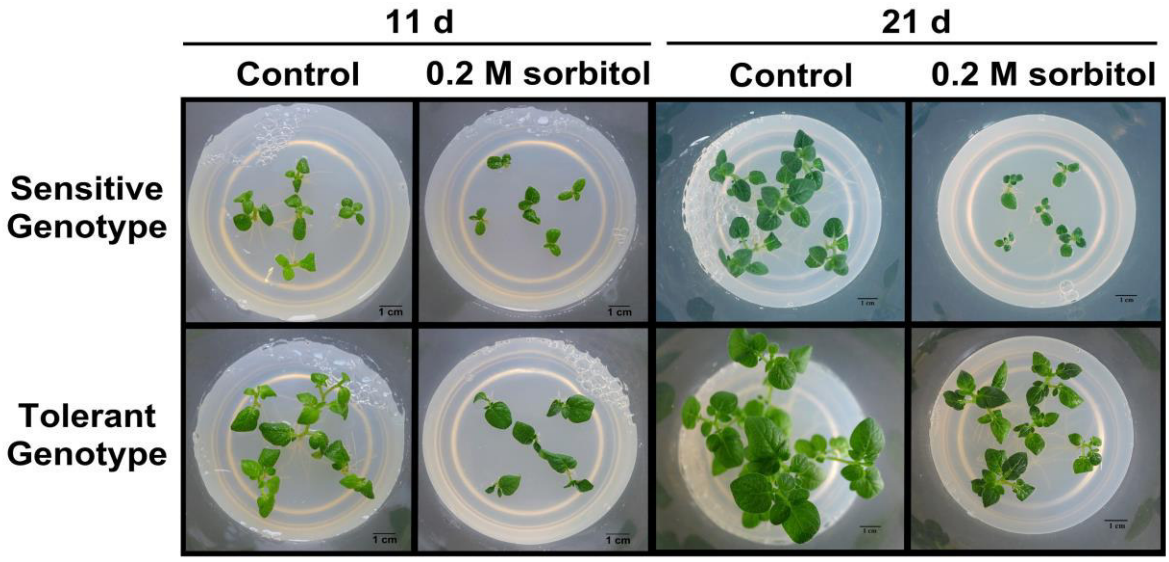


Abbildung 10: Vergleich des Wachstums auf Kontroll- und Stressmedium mit 0,2 M Sorbitol nach 11 und 21

Der Zeitpunkt von 11 Tagen nach Stressbeginn wurde in Absprache mit den Projektpartnern aus dem JKI in Groß Lüsewitz gewählt, da hier die Bewurzelung nahezu abgeschlossen war und erste Symptome in den Stickstoffmangelvarianten nachweisbar waren.

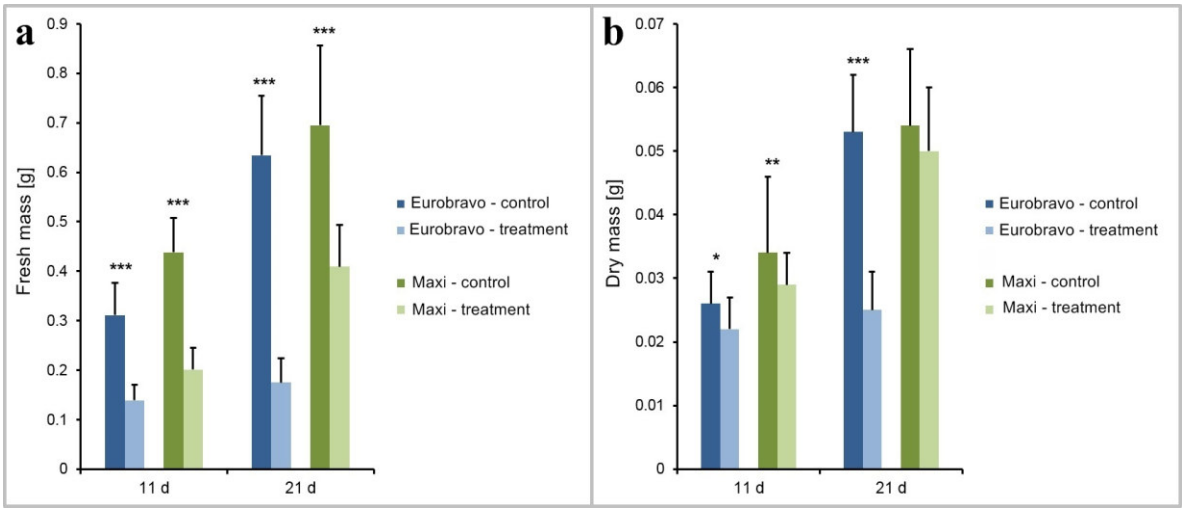


Abbildung 11: Vergleich der Frisch- und Trockenmasse der beiden divergent reagierenden Genotypen nach 11 und 21 Tagen auf Kontroll- und Versuchsmedium. n = 20, Eurobravo 0,2 M n = 19. *** < 0.001. Multiple comparison of means nach Hothorn et al. 2008. Aus Bündig et al. (2016).

Unterschiede zwischen den beiden Genotypen in Bezug auf ihre Masse nach Stressapplikation wurden erst nach 21 Tagen auf dem Versuchsmedium deutlich (Abb. 10 und 11). Hierbei zeigte sich insbesondere nach 21 Tagen in der Trockenmasse ein deutlicher Unterschied. Eine signifikante Verringerung der Masse wurde bei dem sensitiven Genotypen Eurobravo gezeigt, wohingegen keine Reduktion im toleranten Genotyp beobachtet wurde. Da an Tag 11 nach der Stressapplikation jedoch frühere Veränderungen beobachtbar sein sollten, wurde dieser Zeitpunkt für weitere Analysen gewählt.

Tabelle 5: Liste der Spots mit differentiell abundantem Volumen und identifizierte Proteine innerhalb der vier Vergleiche. Jede Reihe zeigt die Anzahl der höher abundanten Spots innerhalb der Vergleiche. Nummern in Klammern stehen für die identifizierten Proteine innerhalb der Spots. Aus Bündig et al. (2016)

Comparison	Samples to be compared		Differential abundant protein spots	Spots identified via MALDI (proteins)	Spots identified via QTOF(proteins)	Total number of identified spots (proteins)
1	Genotype 13 Treatment		5	-	3 (6)	3 (6)
		vs Genotype 13 Control	15	3 (3)	3 (4)	6 (7)
2	Genotype 2 Treatment		49	6 (7)	16 (30)	23 (38)
		vs Genotype 2 Control	69	7 (7)	23 (25)	30 (32)
3	Genotype 2 Treatment		62	12 (13)	6 (16)	18 (29)
		vs Genotype 13 Treatment	72	11 (12)	-	11 (12)
4	Genotype 2 Control		54	13 (14)	3 (3)	16 (17)
		vs Genotype 13 Control	68	13 (14)	2 (3)	15 (17)
Total			394	65	56	122

In Tab. 5 ist die Anzahl der identifizierten Spots aufgeführt. Insgesamt wurden 351 Spots mit Hilfe der Delta 2D Software als differenziell abundant angezeigt. Hiervon konnten insgesamt 100 Spots identifiziert werden. Einige Proteinspots wurden in mehreren Vergleichen gefunden. Ein Protein wurde nur in die Liste aufgenommen, wenn es in beiden

ausgestochenen Spots von zwei unabhängigen Gelen aus den beiden Versuchswiederholungen gefunden wurde. Nur einmal identifizierte Spots wurden nicht berücksichtigt. Gleiche Spotnummern wurden als differentiell abundant in verschiedenen Vergleichen gefunden, sodass eine höhere Gesamtzahl an Spots in Tab. 5 gelistet ist.

Beim Vergleich zwischen der Kontrolle und der Behandlung innerhalb der Genotypen fiel auf, dass der tolerante Genotyp weniger Veränderungen aufzeigte als der sensitive Genotyp: Während beim sensitiven Genotyp 118 Spots differentiell abundant waren, konnten im toleranten Genotyp nur 20 Spots mit signifikant verändertem Volumen aufgezeigt werden.

Vergleich 1 – Kontrolle gegen Behandlung cv. Maxi

Von 20 differentiell abundanten Spots konnten 9 identifiziert werden. Beim toleranten Genotyp wurden eine ATPase katalytische Untereinheit (Spot ID 483), eine Monohydroascorbate Reduktase (Spot ID 243) und eine Peptidyl Prolyl cis-trans Isomerase als höher abundant identifiziert. Ein Abfall der Abundanz konnte z.B. für das Far upstream binding Protein (Spot ID 491) und für ein Chaperon (ID 431) gezeigt werden (Abb. 12 und Tab. 6).

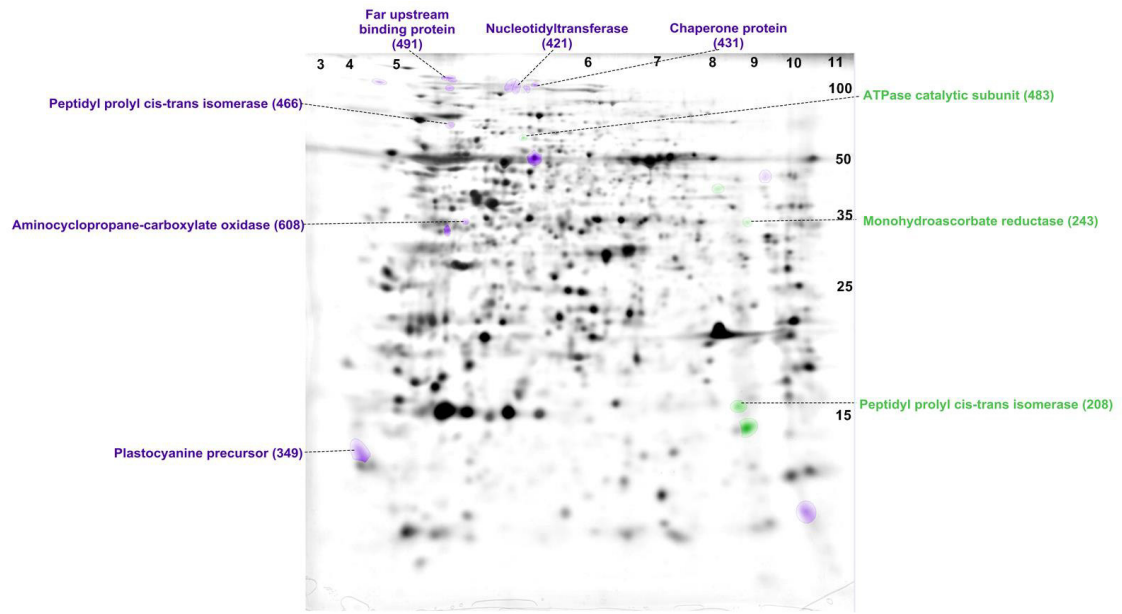


Abbildung 12:Vergleich 1 zwischen der Behandlung mit 0,2 M Sorbitol und der Kontrolle innerhalb des toleranten Genotyps. Violette Spots repräsentieren Proteine, die höher abundant in Kontrollpflanzen waren, grüne Spots repräsentieren Proteine von höherer Abundanz in Gelen von mit 0,2 M Sorbitol behandelten Pflanzen. Nummern hinter den Proteinnamen stehen für die Spot ID der korrespondierenden Spots nach der Delta2D Analyse (Tabelle 6). Nur der erste Treffer, welcher in dem Spot identifiziert wurde, wird gezeigt. Die Spots sind auf einem invertierten fusionierten Image über alle Gele gekennzeichnet. Nummern am Rand stehen für den pI (horizontal) und MW (vertikal). Aus Bündig et al. (2016).

Tabelle 6: Identifizierung der Proteine aus Spots mit differentieller Abundanz im Vergleich 1 zwischen der Behandlung mit 0,2 M Sorbitol und der Kontrolle innerhalb des toleranten Genotyps. Signifikante Unterschiede des Spotvolumens auf Grundlage des normalisierten relativen Spotvolumens wurden mit einem t-test (p-Wert ≤ 0.05) bestimmt. Nur Veränderungen mit einem Unterschied von mind. 1,5-fach wurden als echte Unterschiede auf Proteinlevel gewertet. Aus Bündig et al. (2016).

ID[A]	Reg[B]	Protein name	PGSC numbers	KEGG[C]	Score[D]	PI Calc[E]	MW Calc[F]	Pep[G]	Method[H]	Size[I]	Normalized spot volume[J]
G13C 431	0.39	chaperone protein chloroplastic-like	PGSC0003DMT400003652	Environmental information processing ++	127	6.17	110252	13	MALDI	m	
G13C 421	0.46	probable polyribonucleotide nucleotidyltransferasechloroplastic like	PGSC0003DMT400019741	Nucleotide metabolism	321.55	5.79	98592	12	QTOF	m	
G13C 349	0.50	plastocyanin precursor	PGSC0003DMT400092049	Energy metabolism	366	5.04	16970	3	MALDI	m	
G13C 466	0.56	peptidyl prolyl cis trans isomerase fkbp62 like	PGSC0003DMT400051809	Genetic information processing++	2086.31	5.05	63456	16	QTOF	m	
G13C 466	0.56	protein executer chloroplastic like	PGSC0003DMT400069690	Environmental information processing ++	210.29	5.03	71445	6	QTOF	m	
G13C 608	0.57	1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase	PGSC0003DMT400055332	Amino acid metabolism	102	5.21	36363	4	MALDI	m	
G13C 491	0.66	far upstream element binding protein 2 like	PGSC0003DMT400031096	Genetic information processing++	1569.80	4.72	82586	9	QTOF	l	
G13T 483	2.32	v type proton atpase catalytic subunit a like	PGSC0003DMT400074197	Energy metabolism	2407.39	5.08	68594	15	QTOF	m	
G13T 483	2.32	nad binding rossmann fold superfamily protein isoform 1	PGSC0003DMT400073075	Genetic information processing	821.94	7.94	65202	16	QTOF	m	
G13T 483	2.32	ru large subunit-binding protein subunit	PGSC0003DMT400061700	Genetic information processing	632.02	5.57	62995	12	QTOF	m	

		chloroplastic								
G13T 483	2.32	t complex protein 1 subunit epsilon like	PGSC0003DMT400027968	Genetic information processing	627.21	5.50	24624	9	QTOF	l
G13T 208	2.18	peptidyl prolyl cis trans isomerase fkbp15 1 like	PGSC0003DMT400022512	Environmental information processing ++	11148.51	8.21	16019	5	QTOF	m
G13T 243	2.10	Monodehydroascorbate reductase	PGSC0003DMT400032099	Carbohydrate metabolism	4017.67	8.06	53133	13	QTOF	s

A = ID represents the number of a protein spot in the 2D PAGE gels. Corresponding spots of all gels are labelled with the same ID. G13 stands for the genotype 13 and C or T are standing for control or treatment with 0.2 M sorbitol, respectively.

B = Regulation of a spot according the comparison between groups. Regulation is given as the ratio between spot abundance (stress/ control).

C = Functional classification according to the KEGG Pathway Database (++ = if no classification was automatically annotated, the proteins were manually classified).

D= The protein score obtained either via the MASCOT search algorithm (www.matrixscience.com) or through the ProteinLynx Global Server 2.5.3 (Water Corporation) against a potato protein database, which was based upon the sequences from *Solanum tuberosum* group Phureja DM1-3, which was completely sequenced by the Potato Genome Sequencing Consortium 2011.

E= Calculated PI obtained either via the MASCOT search algorithm (www.matrixscience.com) or through the ProteinLynx Global Server 2.5.3 (Water Corporation) against a potato protein database.

F = Calculated MW obtained via the MASCOT search algorithm (www.matrixscience.com) or through the ProteinLynx Global Server 2.5.3 (Water Corporation) against a potato protein database.

G = Number of peptides matched to the protein through the database search.

H = Method with which the protein was identified. MALDI = MALDI-TOF-MS/MS and QTOF = nLC-ESI-Q-TOF-MS/MS.

I= Molecular weight (MW) in gel as compared to the theoretically expected MW.

m: MW in gel corresponding to the theoretically expected MW ± 15 kDa

s: MW in gel lower than theoretically expected

l: MW in gel larger than theoretically expected

J= Mean relative spot volume obtained in the four gels of control or plants treated with 0.2 M sorbitol at day 11 illustrated by graphs. The first bar (purple) represents the mean normalized spot volume in the gel of the control plants of the tolerant genotype, the second bar (green) represents the mean normalized spot volume in the gel of the treated plants of the tolerant genotype, the third bar (light purple) stands for the mean normalized spot volume in the gels of the control plants of the sensitive genotype and the fourth bar (light green) represents the mean normalized spot volume in the gel of the treated plants of the sensitive genotype. No graph is given if more than one protein per spot was identified.

Vergleich 2 – Kontrolle gegen Behandlung im sensitiven Genotyp Eurobravo

Im Vergleich 2 zwischen der Kontrolle und der Behandlung des sensitiven Genotyps, waren besonders die Proteinase-Inhibitoren und Vorstufen von solchen auffällig präsent (Abb. 13 und Tab. 7). Hierbei handelte es sich um Asparagin- und Cystein-Proteinase-Inhibitoren (IDs 202, 293 und 652) und einen PIN2 Vorläufer (IDs 81, 207, 208). Ebenfalls interessant waren die erhöhte Abundanz von ASR4 (ID 583), Annexin 1d (ID 324) und einer GABA Transaminase (ID 550). Insgesamt konnten von 118 differentiell abundanten Spots 53 identifiziert werden.

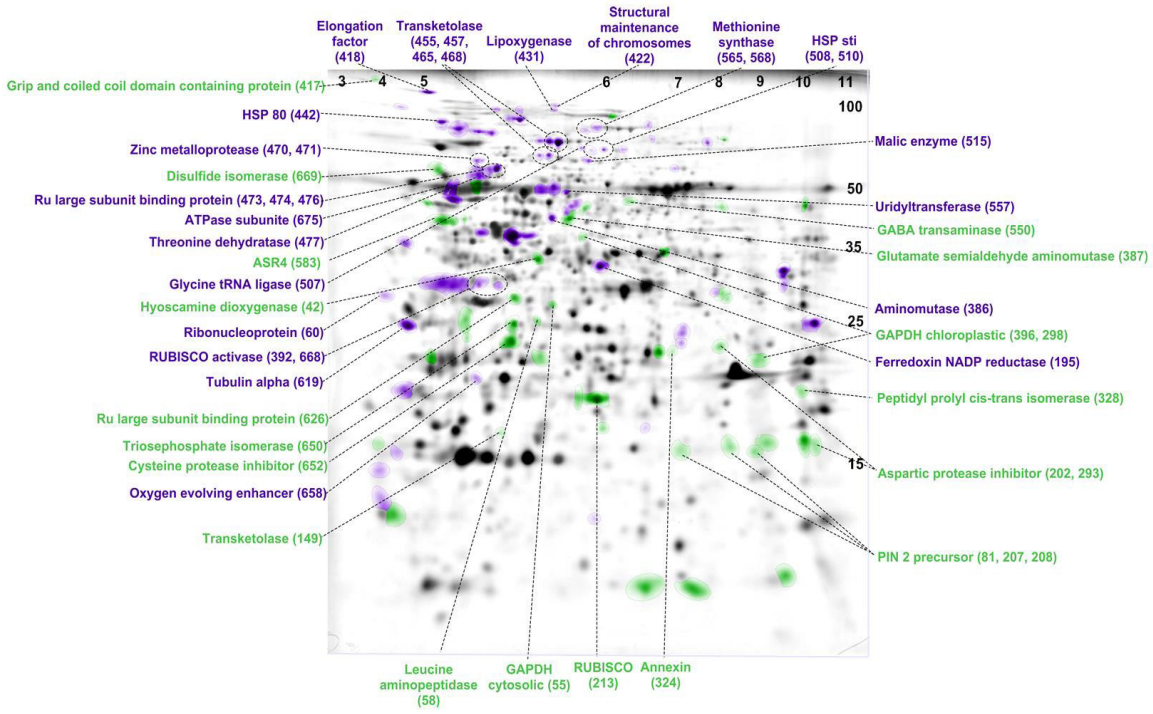


Abbildung 13: Vergleich 2 zwischen der Behandlung mit 0,2 M Sorbitol und der Kontrolle innerhalb des sensitiven Genotyps. Violette Spots repräsentieren Proteine, die höher abundant in Kontrollpflanzen waren, grüne Spots repräsentieren Proteine von höherer Abundanz in Gelen von mit 0,2 M Sorbitol behandelten Pflanzen. Nummern hinter den Proteinnamen stehen für die Spot ID der korrespondierenden Spots nach der Delta2D Analyse (Tabelle 6). Nur der erste Treffer, welcher in dem Spot identifiziert wurde, wird gezeigt. Die Spots sind auf einem invertierten fusionierten Image über alle Gele gekennzeichnet. Nummern am Rand stehen für den pI (horizontal) und MW (vertikal). Aus Bündig et al. (2016).

Wie oben bereits betont, waren im toleranten Genotyp insgesamt 20 Proteine Spots differentiell abundant, wohingegen im sensitiven Genotyp 118 Spots als differentiell abundant gefunden wurden. Dies deutet auf eine erhöhte Stressreaktion im sensitiven Genotyp hin. Ein deutlicher Unterschied in der Reaktion der beiden Genotypen bestand darin, dass im

sensitiven Genotyp vermehrt Proteine identifiziert wurden, welche mit den Chloroplasten assoziierte waren. Hierbei handelte es sich sowohl um geringer als auch um höher abundante Spots nach der Stressapplikation. Dieses Ergebnis zeigt an, dass die Chloroplasten verstärkt von der Stressreaktion im sensitiven Genotyp betroffen waren. Dieses Ergebnis war umso überraschender, da die Photosynthese *in vitro* als vernachlässigbar gilt, da durch geringe CO_2 Konzentration und Zucker im Medium die Endprodukte nur eine geringe Rolle spielen.

Tabelle 7: Identifizierung der Proteine aus Spots mit differentieller Abundanz im Vergleich 1 zwischen der Behandlung mit 0,2 M Sorbitol und der Kontrolle innerhalb des sensitiven Genotyps. Signifikante Unterschiede des Spotvolumens auf Grundlage des normalisierten relativen Spotvolumens wurden mit einem t-test (p-Wert ≤ 0.05) bestimmt. Nur Veränderungen mit einem Unterschied von mind. 1,5-fach wurden als echte Unterschiede auf Proteinlevel gewertet. Aus Bündig et al. (2016).

ID[A]	Reg [B]	Protein name	PGSC numbers	KEGG[C]	Score[D]	PI Calc[E]	MW Calc[F]	Pep[G]	Method[H]	Size[I]	Normalized spot volume[J]
G2C 470	0.18	atp dependent zinc metalloprotease ftsh chloroplastic like	PGSC0003DMT400044601	Environmental information processing	596.85	6.10	74369	14	QTOF	m	
G2C 557	0.20	utp alpha d glucose 1 phosphate uridylyltransferase	PGSC0003DMT400034699	Carbohydrate metabolism	6067.07	5.60	51774	22	QTOF	m	
G2C 431	0.21	linoleate 13s lipoxygenase 2 chloroplastic like	PGSC0003DMT400081909	Lipid metabolism	850.61	6.14	101911	20	QTOF	m	
G2C 422	0.22	structural maintenance of chromosomes protein 4 like	PGSC0003DMT400003351	Cellular Processes	21.66	6.14	141514	9	QTOF	s	
G2C 474	0.23	ru large subunit binding protein subunit chloroplastic like	PGSC0003DMT400006501	Genetic Information Processing	1174.02	5.36	64272	7	QTOF	m	
G2C 471	0.26	atp-dependent zinc metalloprotease ftsh chloroplastic-like	PGSC0003DMT400044601	Environmental information processing	62	6.14	74370	6	MALDI	m	
G2C 510	0.35	heat shock protein sti like	PGSC0003DMT400012208	Environmental information processing ++	1153.72	5.82	65090	21	QTOF	m	
G2C 565	0.39	methionine synthase	PGSC0003DMT400072279	Amino acid metabolism	1653.58	6.17	84544	23	QTOF	m	

G2C 78	0.43	ribulose- -bisphosphate carboxylase oxygenase large subunit	PGSC0003DMT400083063	Energy metabolism	46	7.23	40242	2	MALDI	s
G2C 476	0.49	ru large subunit-binding protein subunit chloroplastic	PGSC0003DMT400061700	Genetic Information Processing	3413.16	5.57	62995	23	QTOF	m
G2C 476	0.49	glucose 6 phosphate isomerase like	PGSC0003DMT400033620	Carbohydrate metabolism	775.11	5.32	67598	12	QTOF	m
G2C 619	0.50	tubulin alpha chain like	PGSC0003DMT400022574	Cellular Processes	2522.22	4.73	49576	7	QTOF	s
G2C 386	0.51	2476393 glutamate 1 semialdehyde aminomutase	PGSC0003DMT400082447	Metabolism of cofactors and vitamins	8356.27	6.57	51401	13	QTOF	m
G2C 418	0.53	elongation factor ts isoform 2	PGSC0003DMT400008133	Genetic Information Processing ++	72	4.72	114201	8	MALDI	s
G2C 473	0.54	ru large subunit-binding protein subunit chloroplastic	PGSC0003DMT400061700	Genetic Information Processing	7607.11	5.57	62995	29	QTOF	m
G2C 507	0.54	glycine trna ligase mitochondrial like	PGSC0003DMT400036931	Genetic Information Processing	887.92	5.60	70141	16	QTOF	m
G2C 60	0.55	29 kda ribonucleoprotein chloroplastic like	PGSC0003DMT400055527	Genetic Information Processing ++	11810.17	4.45	31305	13	QTOF	m
G2C 477	0.56	threonine dehydratase chloroplastic like	PGSC0003DMT400033801	Amino acid metabolism	1265.12	5.04	64723	12	QTOF	m
G2C 568	0.56	methionine synthase	PGSC0003DMT400072279	Amino acid metabolism	282.28	6.17	84544	12	QTOF	m

G2C 658	0.56	oxygen evolving enhancer protein chloroplastic like isoform x1	PGSC0003DMT400002421	Energy metabolism	3381.04	6.38	30373	10	QTOF	m	
G2C 442	0.57	heat shock cognate protein 80	PGSC0003DMT400057003	Environmental Information Processing	7500.35	4.76	80221	37	QTOF	m	
G2C 457	0.57	transketolase 1	PGSC0003DMT400018062	Carbohydrate metabolism	728.48	6.22	80159	11	QTOF	m	
G2C 465	0.57	tktc soltuame full chloroplastic short tk flags precursor	PGSC0003DMT400056799	Carbohydrate metabolism	113.86	5.91	79928	5	QTOF	s	
G2C 468	0.61	tktc soltuame full chloroplastic short tk flags precursor	PGSC0003DMT400056799	Carbohydrate metabolism	2358.69	5.91	79928	13	QTOF	s	
G2C 508	0.61	heat shock protein sti like	PGSC0003DMT400012208	Environmental information processing ++	7259.62	5.82	65090	33	QTOF	m	
G2C 455	0.65	transketolase 1	PGSC0003DMT400018062	Carbohydrate metabolism	2182.96	6.22	80159	15	QTOF	m	
G2C 515	0.65	nadp dependent malic enzyme like	PGSC0003DMT400084201	Carbohydrate metabolism	231.54	5.62	64057	11	QTOF	m	
G2C 675	0.65	v-type proton atpase subunit b2-like	PGSC0003DMT400008800	Energy metabolism	183	5.45	58410	6	MALDI	m	
G2C 195	0.66	383130 ferredoxin-nadp reductase	PGSC0003DMT400009192	Energy metabolism	190	8.37	40432	6	MALDI	m	
G2C 392	0.66	chloroplast rubisco activase	PGSC0003DMT400049256	Energy metabolism ++	334	8.10	48089	6	MALDI	m	

G2C 668	0.67	chloroplast rubisco activase	PGSC0003DMT400049256	Energy metabolism ++	563	8.10	48089	6	MALDI	m
G2T 55	5.56	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase cytosolic	PGSC0003DMT400044944	Carbohydrate metabolism	57	6.34	36624	2	MALDI	m
G2T 149	3.39	tktc soltuame full chloroplastic short tk flags precursor	PGSC0003DMT400056799	Carbohydrate metabolism	1929.42	5.91	79928	3	QTOF	s
G2T 293	3.07	aspartic protease inhibitor 5-like	PGSC0003DMT400024601	Genetic information processing ++	105	8.04	23921	2	MALDI	m
G2T 298	2.14	glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase chloroplastic like	PGSC0003DMT400030050	Energy metabolism	1833.09	8.38	42861	7	QTOF	s
G2T 324	2.89	annexin d1 like	PGSC0003DMT400045665	Environmental Information Processing ++	885.69	5.23	35823	11	QTOF	m
G2T 417	2.54	grip and coiled coil domain containing	PGSC0003DMT400046956	Uncharacterized ++	7953.63	4.08	85846	27	QTOF	l
G2T 202	2.46	aspartic protease inhibitor 5 like	PGSC0003DMT400024601	Genetic information processing ++	5425.74	7.77	23921	4	QTOF	m
G2T 81	2.42	700407 proteinase inhibitor ii precursor type a a	PGSC0003DMT400011562	Genetic information processing++	6643.65	6.79	16648	5	QTOF	m
G2T 213	2.40	ribulose bisphosphate carboxylase oxygenase large subunit	PGSC0003DMT400083063	Energy metabolism	2783.69	730	40242	6	QTOF	s
G2T 550	2.40	gamma aminobutyrate transaminase 2 like	PGSC0003DMT400062385	Carbohydrate metabolism	5453.86	5.02	33499	11	QTOF	m

G2T 180	2.30	chloroplast stem loop binding protein of 41 kda chloroplastic like	PGSC0003DMT400069189	Genetic information processing++	1188.34	8.32	46007	6	QTOF	m
G2T 387	2.12	2476393 glutamate 1 semialdehyde aminomutase	PGSC0003DMT400082447	Metabolism of cofactors and vitamins	4393.55	6.57	51401	7	QTOF	m
G2T 387	2.12	saccharopine dehydrogenase isoform 2	PGSC0003DMT400088617	Environmental Information Processing ++	1054.27	6.55	46637	11	QTOF	m
G2T 387	2.12	protein tic chloroplastic like	PGSC0003DMT400005492	Genetic information processing++	868.67	9.35	52530	8	QTOF	m
G2T 626	1.92	ru large subunit binding protein subunit chloroplastic like	PGSC0003DMT400061700	Genetic Information Processing	3239.37	5.57	62995	14	QTOF	s
G2T 208	1.87	700407 proteinase inhibitor ii precursor type a a	PGSC0003DMT400011562	Genetic information processing ++	9003.35	6.79	16648	6	QTOF	m
G2T 208	1.87	peptidyl prolyl cis trans isomerase fkbp15 1 like	PGSC0003DMT400022512	Genetic information processing ++	11148.51	8.21	16019	5	QTOF	m
G2T 208	1.87	aspartic protease inhibitor 5 like	PGSC0003DMT400024601	Genetic information processing ++	1953.03	7.77	23921	5	QTOF	m
G2T 583	1.85	asr4 protein	PGSC0003DMT400017057	Environmental Information Processing ++	6697.71	4.74	33936	10	QTOF	m
G2T 583	1.85	threonine dehydratase chloroplastic like	PGSC0003DMT400033801	Amino acid metabolism	2895.10	5.04	64723	13	QTOF	s
G2T 583	1.85	heat shock cognate 70 kda protein 2 like	PGSC0003DMT400023039	Genetic Information Processing	2334.63	4.95	71193	16	QTOF	s
G2T 583	1.85	heat shock cognate 70 kda	PGSC0003DMT400001180	Genetic Information Processing	776.72	4.95	71269	10	QTOF	s
G2T 583	1.85	endoplasmin homolog	PGSC0003DMT400050556	Genetic Information Processing	493.08	4.70	90856	14	QTOF	s
G2T 583	1.85	rhodanese like domain containing protein chloroplastic like	PGSC0003DMT400000605	No information	246.84	4.78	47067	7	QTOF	m
G2T 328	1.83	peptidyl prolyl cis trans isomerase like	PGSC0003DMT400004125	Genetic information processing ++	2263.22	8.73	17913	3	QTOF	m

G2T 652	**1.80**	**cysteine protease inhibitor 8-like**	**PGSC0003DMT400026280**	**Genetic information processing++**	**79**	**5.52**	**24706**	**1**	**MALDI**	**m**
G2T 652	**1.80**	**triosephosphate isomerase chloroplastic-like**	**PGSC0003DMT400004042**	**Carbohydrate metabolism**	**80**	**6.89**	**34647**	**2**	**MALDI**	**m**
G2T 669	**1.74**	**protein disulfide isomerase like**	**PGSC0003DMT400010624**	**Genetic Information Processing**	**6943.30**	**4.62**	**54862**	**19**	**QTOF**	**m**
G2T 207	**1.69**	**700407 proteinase inhibitor ii precursor type a a,**	**PGSC0003DMT400011562**	**Genetic information processing ++**	**8279.90**	**6.79**	**16648**	**6**	**QTOF**	**m**
G2T 58	**1.64**	**leucine aminopeptidase**	**PGSC0003DMT400017373**	**Amino acid metabolism ++**	**58**	**8.52**	**19866**	**1**	**MALDI**	**m**
G2T 396	**1.60**	**glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase chloroplastic like**	**PGSC0003DMT400075608**	**Energy metabolism**	**2865.68**	**7.47**	**47896**	**11**	**QTOF**	**m**
G2T 42	**1.59**	**hyoscyamine 6-dioxygenase-like**	**PGSC0003DMT400030676**	**Biosynthesis of other secondary metabolites**	**43**	**5.54**	**37857**	**2**	**MALDI**	**m**
G2T 650	**1.52**	**triosephosphate isomerase chloroplastic-like**	**PGSC0003DMT400004042**	**Carbohydrate metabolism**	**80**	**6.89**	**34647**	**2**	**MALDI**	**m**

A = ID represents the number of a protein spot in the 2D PAGE gels. Corresponding spots of all gels are labelled with the same ID. G2 stands for the genotype 2 and C or T are standing for control or treatment with 0.2 M sorbitol, respectively.

B = Regulation of a spot according the comparison between groups. Regulation is given as the ratio between spot abundance (stress/ control).

C = Functional classification according to the KEGG Pathway Database (++ = if no classification was automatically annotated, the proteins were manually classified).

D= The protein score obtained either via the MASCOT search algorithm (www.matrixscience.com) or through the ProteinLynx Global Server 2.5.3 (Water Corporation) against a potato protein database, which was based upon the sequences from *Solanum tuberosum* group Phureja DM1-3, which was completely sequenced by the Potato Genome Sequencing Consortium 2011.

E= Calculated PI obtained either via the MASCOT search algorithm (www.matrixscience.com) or through the ProteinLynx Global Server 2.5.3 (Water Corporation) against a potato protein database.

F = Calculated MW obtained via the MASCOT search algorithm (www.matrixscience.com) or through the ProteinLynx Global Server 2.5.3 (Water Corporation) against a potato protein database.

G = Number of peptides matched to the protein through the database search.

H = Method with which the protein was identified. MALDI = MALDI-TOF-MS/MS and QTOF = nLC-ESI-Q-TOF-MS/MS.

I= Molecular weight (MW) in gel as compared to the theoretically expected MW.

m: MW in gel corresponding to the theoretically expected MW ± 15 kDa

s: MW in gel lower than theoretically expected

l: MW in gel larger than theoretically expected

J= Mean relative spot volume obtained in the four gels of control or plants treated with 0.2 M sorbitol at day 11 illustrated by graphs. The first bar (purple) represents the mean normalized spot volume in the gel of the control plants of the tolerant genotype, the second bar (green) represents the mean normalized spot volume in the gel of the treated plants of the tolerant genotype, the third bar (light purple) stands for the mean normalized spot volume in the gels of the control plants of the sensitive genotype and the fourth bar (light green) represents the mean normalized spot volume in the gel of the treated plants of the sensitive genotype. No graph is given if more than one protein per spot was identified.

Vergleich 3 – Behandlung toleranter Genotyp gegen Behandlung sensitiver Genotyp

Von 134 differentiell abundanten Spots konnten 29 identifiziert werden. Proteine, die als höher abundant im sensitiven Genotyp identifiziert werden konnten (pinke Spots in Abb. 14), waren Proteine die eine Funktion im Proteinschutz hatten (Protease Inhibitoren, Heat Shock Proteins und Chaperone), ein ROS (Reaktive Sauerstoffspezies) Entgiftungsenzym (Superoxid Dismutase, Spot 154) und stress-induzierbare Proteine (glycine-rich protein, Spot 152 und osmotin-like protein, Spot 288) (Abb. 14 und Tab. 8). Im toleranten Genotyp wurden Proteine für Wachstum, Zellwandbildung/-stabilisierung und den Energiestoffwechsel identifiziert (dynamin related protein, a probable rhamnose biosynthetic enzyme 1-like protein und eine NADH dehydrogenase, Spots 12,05/06 und 445).

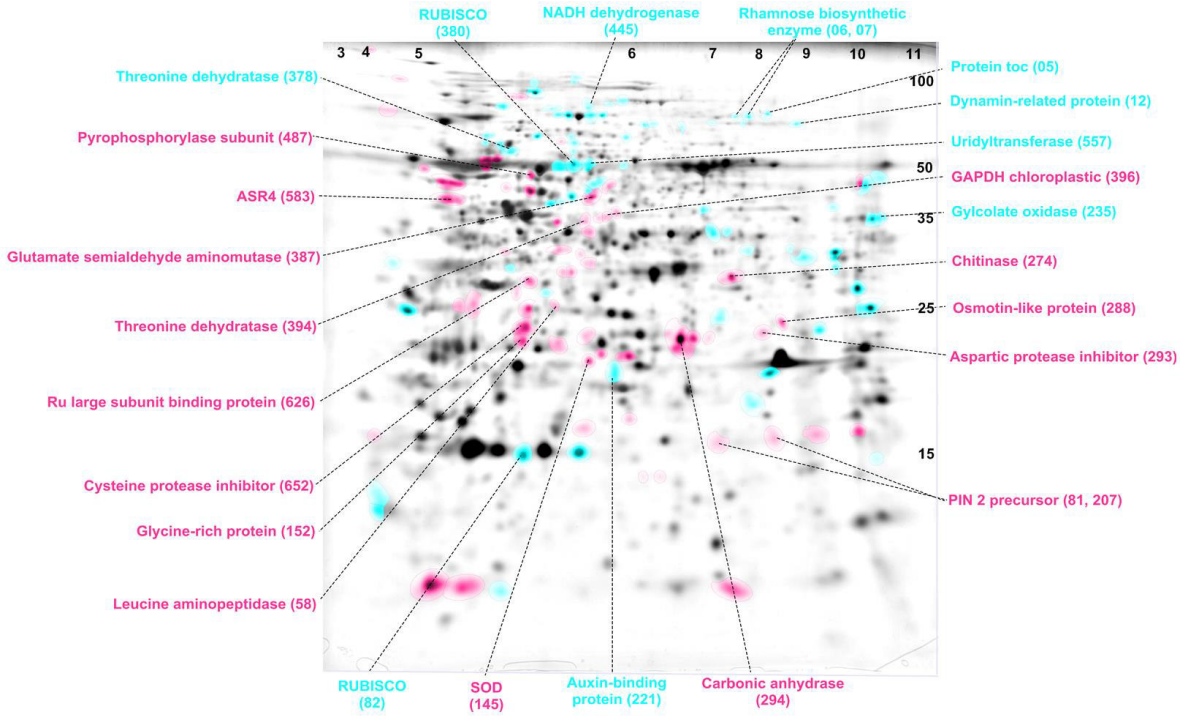


Abbildung 14: Vergleich 3 zwischen den Behandlungen mit 0,2 M Sorbitol der beiden Genotypen. Pinkfarbene Spots repräsentieren Proteine, die höher abundant in behandelten Pflanzen des sensitiven Genotyps waren, blaue Spots repräsentieren Proteine von höherer Abundanz in Gelen von mit 0,2 M Sorbitol behandelten Pflanzen des toleranten Genotyps. Nummern hinter den Proteinnamen stehen für die Spot ID der korrespondierenden Spots nach der Delta2D Analyse (Tabelle 8). Nur der erste Treffer, welcher in dem Spot identifiziert wurde, wird gezeigt. Die Spots sind auf einem invertierten fusionierten Image über alle Gele gekennzeichnet. Nummern am Rand stehen für den pI (horizontal) und MW (vertikal). Aus Bündig et al. (2016).

Im toleranten Genotyp wurde ebenfalls ein ROS entgiftendes Enzyme (Glycolate oxidase, Spot 235) identifiziert. Die Spots mit der Nummer 154, 288, 577 und 583 (Superoxid dismutase, osmotin-like protein, ein uncharakterisiertes Protein und ASR4) wurden als höher

abundant im sensitiven Genotypen gefunden. Interessanterweise fielen diese Proteine ebenfalls als differentiell abundant auf, wenn die Proteome der beiden Genotypen unter Kontrollbehandlungen verglichen wurde. Die Proteine waren jedoch generell geringer abundant nach der Behandlung.

Tabelle 8: Identifizierung der Proteine aus Spots mit differentieller Abundanz im Vergleich 3 zwischen den Behandlungen mit 0,2 M Sorbitol der beiden Genotypen. Signifikante Unterschiede des Spotvolumens auf Grundlage des normalisierten relativen Spotvolumens wurden mit einem t-test (p-Wert ≤ 0.05) bestimmt. Nur Veränderungen mit einem Unterschied von mind. 1,5-fach wurden als echte Unterschiede auf Proteinlevel gewertet. Aus Bündig et al. (2016).

ID[A]	Reg[B]	Protein name	PGSC numbers	KEGG[C]	Score[D]	PI Calc[E]	MW Calc[F]	Pep[G]	Method[H]	Size[I]	Normalized spot volume[J]
G2T 154	7.34	superoxide dismutase	PGSC0003DMT400070920	Environmental Information Processing	120	6.60	28305	2	MALDI	m	
G2T 207	6.97	700407 proteinase inhibitor ii precursor type a a	PGSC0003DMT400011562	Genetic information processing++	8279.90	6.79	16648	6	QTOF	m	
G2T 58	6.79	leucine aminopeptidase	PGSC0003DMT400017373	Metabolism of other amino acids	58	8.52	19866	1	MALDI	m	
G2T 293	3.25	aspartic protease inhibitor 5-like	PGSC0003DMT400024601	Genetic information processing++	105	8.04	23921	2	MALDI	m	
G2T 626	3.11	ru large subunit binding protein subunit chloroplastic like	PGSC0003DMT400061700	Genetic Information Processing	3239.37	5.57	62995	14	QTOF	s	
G2T 583	2.20	asr4 protein	PGSC0003DMT400017057	Environmental Information Processing ++	6697.71	4.74	33936	10	QTOF	m	
G2T 583	1.85	threonine dehydratase chloroplastic like	PGSC0003DMT400033801	Amino acid metabolism	2895.10	5.04	64723	13	QTOF	s	
G2T 583	1.85	heat shock cognate 70 kda protein 2 like	PGSC0003DMT400023039	Genetic Information Processing	2334.63	4.95	71193	16	QTOF	s	
G2T 583	1.85	heat shock cognate 70 kda	PGSC0003DMT400001180	Genetic Information Processing	776.72	4.95	71269	10	QTOF	s	
G2T 583	1.85	endoplasmin homolog	PGSC0003DMT400050556	Genetic Information Processing	493.08	4.70	90856	14	QTOF	s	
G2T 583	1.85	rhodanese like domain containing protein chloroplasticlike	PGSC0003DMT400000605	No information	246.84	4.78	47067	7	QTOF	m	

G2T 288	2.09	osmotin-like protein	PGSC0003DMT400001066	Environmental Information Processing ++	105	7.56	27158	9	MALDI	m
G2T 274	1.87	chi2_soltu ame: full=endochitinase 2 flags: precursor	PGSC0003DMT400069033	Carbohydrate metabolism	286	6.18	34095	4	MALDI	m
G2T 577	1.85	PREDICTED: uncharacterized protein At5g39570-like	PGSC0003DMT400003630	uncharacterised	410	4.67	40963	7	MALDI	m
G2T 652	1.82	cysteine protease inhibitor 8-like	PGSC0003DMT400026280	Genetic information processing++	79	5.52	24706	1	MALDI	m
G2T 396	1.81	glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase chloroplastic like	PGSC0003DMT400075608	Carbohydrate metabolism	2865.68	7.47	47896	11	QTOF	m
G2T 294	1.65	carbonic chloroplastic-like isoform x2	PGSC0003DMT400001297	Energy metabolism	406	6.40	34520	6	MALDI	m
G2T 650	1.64	triosephosphate isomerase chloroplastic-like	PGSC0003DMT400004042	Carbohydrate metabolism	80	6.89	34647	2	MALDI	m
G2T 81	1.61	700407 proteinase inhibitor ii precursor type a a	PGSC0003DMT400011562	Genetic information processing++	6643.65	6.79	16648	5	QTOF	m
G2T 152	1.59	glycine-rich protein 2-like	PGSC0003DMT400004028	Genetic information processing++	188	4.82	13741	3	MALDI	m
G2T 387	1.51	2476393 glutamate 1 semialdehyde aminomutase	PGSC0003DMT400082447	Metabolism of cofactors and vitamins	4393.55	6.57	51401	7	QTOF	m
G2T 387	2.12	saccharopine dehydrogenase isoform 2	PGSC0003DMT400088617	Environmental Information Processing ++	1054.27	6.55	46637	11	QTOF	m
G2T 387	2.12	protein tic chloroplastic like	PGSC0003DMT400005492	Genetic information processing++	868.67	9.35	52530	8	QTOF	m

G2T 487	1.51	adp-glucose pyrophosphorylase small subunit	PGSC0003DMT400079823	Carbohydrate metabolism	235	6.73	57190	6	MALDI	m
G13T 82	0.18	ribulose- -bisphosphate carboxylase oxygenase small subunit	PGSC0003DMT400050381	Energy metabolism	184	7.56	20562	3	MALDI	m
G13T 06	0.25	probable rhamnose biosynthetic enzyme 1-like	PGSC0003DMT400018192	Carbohydrate metabolism	282	6.75	75660	5	MALDI	m
G13T 05	0.29	protein toc75- chloroplastic-like	PGSC0003DMT400078190	Environmental Information Processing ++	321	8.42	91403	7	MALDI	m
G13T 557	0.33	utp:alpha-d-glucose-1-phosphate uridylyltransferase	PGSC0003DMT400034699	Carbohydrate metabolism	110	5.70	51774	2	MALDI	m
G13T 478	0.35	threonine dehydratase chloroplastic-like	PGSC0003DMT400033801	Amino acid metabolism	189	5.22	64723	5	MALDI	m
G13T 445	0.39	nadh dehydrogenase	PGSC0003DMT400034638	Energy metabolism	68	6.05	79799	2	MALDI	m
G13T 07	0.43	probable rhamnose biosynthetic enzyme 1-like	PGSC0003DMT400054753	Carbohydrate metabolism	84	6.57	75521	2	MALDI	m
G13T 235	0.48	glycolate oxidase	PGSC0003DMT400071115	Carbohydrate metabolism	108	9.26	40585	3	MALDI	m
G13T380	0.49	ribulose- -bisphosphate carboxylase oxygenase large subunit	PGSC0003DMT400083063	Energy metabolism	176	7.23	40242	4	MALDI	m

G13T 12	**0.51**	**dynamin-related protein 1e-like**	**PGSC0003DMT400004319**	**Cellular process ++**	**138**	**7.62**	**68574**	**16**	**MALDI**	**m**	
G13T 221	**0.67**	**auxin-binding protein abp19a-like**	**PGSC0003DMT400036428**	**Cellular process ++**	**109**	**5.83**	**21506**	**1**	**MALDI**	**m**	

A = ID represents the number of a protein spot in the 2D PAGE gels. Corresponding spots of all gels are labelled with the same ID. G2 stands for the genotype 2, G13 for the genotype 13 and T is standing for treatment with 0.2 M sorbitol.

B = Regulation of a spot according the comparison between groups. Regulation is given as the ratio between spot abundance (stress sensitive genotype/ stress tolerant genotype).

C = Functional classification according to the KEGG Pathway Database (++ = if no classification was automatically annotated, the proteins were manually classified).

D= The protein score obtained either via the MASCOT search algorithm (www.matrixscience.com) or through the ProteinLynx Global Server 2.5.3 (Water Corporation) against a potato protein database, which was based upon the sequences from *Solanum tuberosum* group Phureja DM1-3, which was completely sequenced by the Potato Genome Sequencing Consortium 2011.

E= Calculated PI obtained either via the MASCOT search algorithm (www.matrixscience.com) or through the ProteinLynx Global Server 2.5.3 (Water Corporation) against a potato protein database.

F = Calculated MW obtained via the MASCOT search algorithm (www.matrixscience.com) or through the ProteinLynx Global Server 2.5.3 (Water Corporation) against a potato protein database.

G = Number of peptides matched to the protein through the database search.

H = Method with which the protein was identified. MALDI = MALDI-TOF-MS/MS and QTOF = nLC-ESI-Q-TOF-MS/MS.

I= Molecular weight (MW) in gel as compared to the theoretically expected MW.

m: MW in gel corresponding to the theoretically expected MW ± 15 kDa

s: MW in gel lower than theoretically expected

l: MW in gel larger than theoretically expected

J= Mean relative spot volume obtained in the four gels of control or plants treated with 0.2 M sorbitol at day 11 illustrated by graphs. The first bar (purple) represents the mean normalized spot volume in the gel of the control plants of the tolerant genotype, the second bar (green) represents the mean normalized spot volume in the gel of the treated plants of the tolerant genotype, the third bar (light purple) stands for the mean normalized spot volume in the gels of the control plants of the sensitive genotype and the fourth bar (light green) represents the mean normalized spot volume in the gel of the treated plants of the sensitive genotype. No graph is given if more than one protein per spot was identified.

Diese Studie zeigte zum ersten Mal die Unterschiede zweier divergierend reagierender Stärkekartoffelgenotypen unter osmotischem Stress *in vitro* auf. Dass nur ein geringer Anteil aller differentiell abundanten Spots identifiziert wurde, könnte das Gesamtergebnis verzerren. Nichtsdestotrotz wurden einige der in der Literatur beschriebenen Stressreaktionen gefunden. Diese Ergebnisse geben Hinweise darauf, dass der Unterschied zwischen dem toleranten und sensitiven Genotyp an Tag 11 nach der Stressapplikation auf einem unterschiedlichen Zeitbedürfnis für die Stressakklimatisierung beruht. Die beiden Genotypen unterscheiden sich in der Protolyse und den ROS-entgiftenden oder -produzierenden Enzymen. Die Vermutung liegt nahe, dass während der sensitive Genotyp noch stark auf den applizierten Stress reagiert, sich der tolerante Genotyp bereits in einer Phase der Akklimatisierung befindet und zu normalem Wachstum zurückkehrt. Die identifizierten Proteinase-Inhibitoren und der Vorläufer (Spotvolumen basierend auf Kontrolle/ Behandlung, Proben des sensitiven Genotyps Spot 81, 0,070/0,169; Spot 202, 0,113/0,278; Spot 207, 0,176/0,282; Spot 208; Spot 293, 0,053/0,162; Spot 652), das ASR4 Protein (Spot 583) und Annexin d1 (Spot 324, 0,025/0,072) im sensitiven Genotyp sollten weiter untersucht werden. Im toleranten Genotypen wären folgende Proteine interessante Kandidaten, um als Biomarker zu fungieren (Spotvolumen basierend auf behandelten Proben des Vergleichs toleranter/sensitiver Genotyp: probable rhamnose biosynthetic enzyme (Spot 12, 0,038/0,019), glycolate oxidase (Spot 235, 0,37/0,186) und dynamin-related protein (Spot 06, 0,063/0,016; Spot 07, 0,028/0,012).

Um weitere Stressantworten von Stärkekartoffeln *in vitro* aufzudecken, sollte eine Zeitreihe mit früheren Zeitpunkten durchgeführt werden. Darüber hinaus sollte insbesondere der Vergleich der osmotischen Reaktion *in vitro* und der Trockenstressantworten aus dem Rainout-Shelter Versuch verglichen werden. Weitere Einblicke würde eine LC-MS- Analyse ermöglichen mit deren Hilfe einige Limitierungen der gelbasierten Proteomik überwunden werden können. Hierzu zählen vor allem deren geringere Sensitivität, die geringe Löslichkeit von Membranproteinen und die Restriktionen im Hinblick auf hydrophile Proteine.

Analyse der Metabolitprofile der beiden divergent reagierenden Genotypen. Wird Sorbitol aufgenommen?

Die Metabolitanalyse sollte Veränderungen im Metabolitenprofil nachweisen und zeigen, ob Sorbitol von den Pflanzen in diesem experimentellen Setup aufgenommen wird oder nicht. Diese war von großem Interesse, da zahlreiche Arbeiten in der Literatur dieses Setup

verwenden, um osmotischen Stress *in vitro* zu applizieren. Es wurden wichtige Metaboliten analysiert und mit Hilfe von Standardkurven quantifiziert. In Abb. 15 sind exemplarische Chromatogramme der GC/MS Läufe aufgeführt. Auffällig war hier besonders der Peak bei RTI (Retention Time Index) 670. Dieser wurde nur in behandelten Pflanzenproben gefunden, jedoch nicht in Kontrollpflanzen.

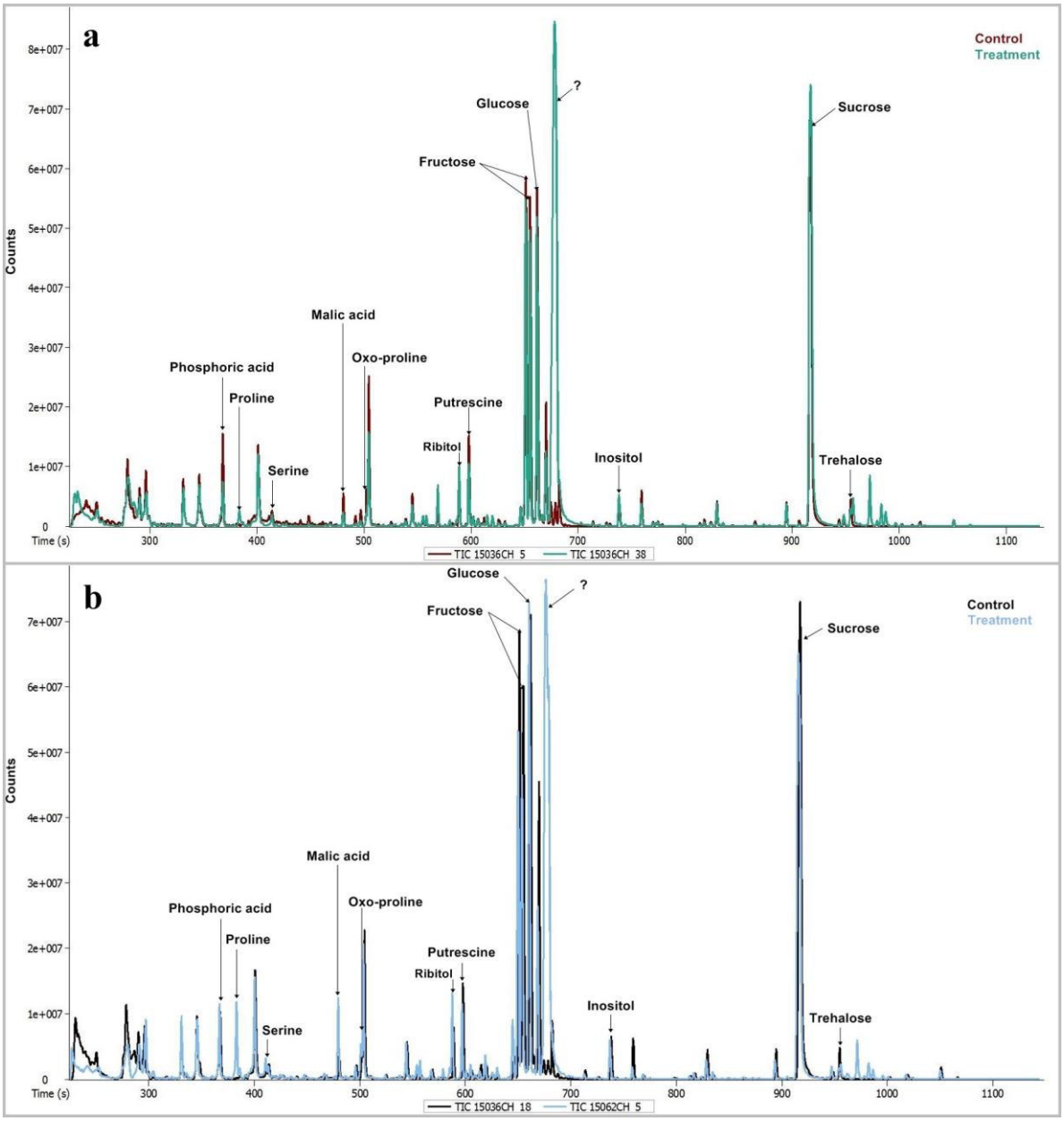


Abbildung 15: Exemplarische Chromatogramme im TIC (Total Ion Count) Überblick von Proben der beiden divergierend reagierenden Genotypen mit der Bezeichnung von einigen der 28 detektierten Metaboliten. A = sensitiver Genotyp Eurobravo (braun = Kontrolle, grün = Behandlung mit 0,2 M Sorbitol), b = toleranter Genotyp Maxi (schwarz = Kontrolle, blau = Behandlung mit 0,2 M Sorbitol). Es wurden 25 µl Volumen analysiert.

Tabelle 9: Mittelwerte mit Standardabweichungen der detektierten Metabolite in µmol/ g DM in Sprossproben nach 11 Tagen auf Medium mit und ohne 0,2 M Sorbitol. Das Verhältnis zwischen der Behandlung und der Kontrolle ist dargestellt. Sternchen hinter dem Verhältnis stehen für signifikante Unterschiede zwischen Behandlung und Kontrolle (* ≤ 0.001, ** ≤0.01, *≤ 0.05). Für Putrescin, Spermidin und Phosphorsäure wurde die Peakhöhe über alle Proben berechnet. Grün = höher abundant nach Stress; orange = geringer abundant nach Stress; gelb = Signifikanter Unterschied zwischen den Genotypen. n = Anhang Tabelle 3 für individuelle n Nummern.**

	Sensitive genotype			Tolerant genotype		
	Control [A] Mean ± SD	0.2 M sorbitol [B] Mean ± SD	Ratio Stress:control	Control Mean ± SD	0.2 M sorbitol Mean ± SD	Ratio Stress:control
Alpha-ketoglutarate (198)	16.60 ± 6.92	7.13 ± 1.61	0.43***	12.94 ± 4.93	5.28 ± 1.77	0.41***
Ascorbate (173)	4.63 ± 1.12	3.61 ± 0.90	0.78**	5.89 ± 1.18	4.36 ± 0.98	0.74***
Asparagine(188)	63.46 ± 33.41***	135.71 ± 52.38***	2.14	326.11 ± 338.02	11.83 ± 12.06	0.04***
Aspartate (232)	6.40 ± 2.20	1.93 ± 0.34	0.30***	5.75 ± 2.21	1.70 ± 0.43	0.30***
Citric acid (183)	1.99 ± 0.94	0.91 ± 0.24**	0.46***	1.25 ± 0.52	1.61 ± 0.51	1.29
Fructose (217)	152.36 ± 38.78	78.62 ± 26.41*	0.52***	253.77 ± 49.95	94.49 ± 20.01	0.37***
Fumaric acid (245)	3.51 ± 1.76**	0.34 ± 0.10***	0.10***	6.35 ± 1.99	3.35 ± 1.23	0.53***
GABA (174)	2.44 ± 1.14	0.61 ± 0.09***	0.25***	3.40 ± 1.25	1.20 ± 0.34	0.35***
Glucose (319)	114.69 ± 35.93***	53.22 ± 20.07	0.46***	251.88 ± 57.02	58.41 ± 49.59	0.23***
Glutamate (246)	25.60 ± 10.29	13.71 2.12±	0.54***	35.70 ± 12.35	12.26 ± 2.32	0.34***
Glycine (174)	1.20± 0.49***	4.49± 1.71	3.75***	4.82 ± 3.87	3.53 ± 1.51	0.73
Isoleucine (158)	0.67 ± 0.21	0.59 ± 0.14***	0.88	0.65 ± 0.28	0.32 ± 0.09	0.50***
Malic acid (233)	11.10 ± 4.97	3.91 ± 0.80***	0.35***	12.28 ± 4.47	8.56 ± 3.19	0.70**
myo-Inositol (305)	7.58 ± 2.09	7.00 ± 0.74	0.92	10.13 ± 3.64	7.99 ± 1.74	0.79*
oxo-proline (258)	39.56 ± 18.09	14.22 ± 4.78*	0.36***	42.41 ± 17.96	22.16 ± 9.19	0.52***
Phenylalanine (218)	0.87 ± 0.20	1.20 ± 0.17***	1.38***	0.69 ± 0.29	0.56 ± 0.15	0.81
Proline (142)	1.22 ± 0.63	8.85 ± 3.40	7.24***	0.87 ± 0.35	9.87 ± 5.75	11.39***
Serine (204)	3.93 ± 1.12	2.49 ± 0.57***	0.63***	4.18 ± 1.80	1.30 ± 0.38	0.31***
Succinate (247)	1.43 ± 0.91	0.58 ± 0.28	0.40***	1.37 ± 0.78	0.52 ± 0.23	0.38***
Sucrose (437)	334.10 ± 109.49	416.73 ± 108.58	1.25*	471.62 ± 96.10	337.68 ± 29.51	0.72**
Threonine (219)	1.79 ± 0.60	0.74 ± 0.18	0.41***	1.40 ± 0.59	0.52 ± 0.15	0.37***
Trehalose (191)	2.18± 0.71**	1.69 ± 0.96	0.78	4.46 ± 2.67	2.17 ± 0.90	0.49**
Urea (171)	1.60 ± 0.91	0.75 ± 0.43***	0.47***	1.12 ± 0.73	0.30 ± 0.17	0.26***
Putrescine	$2257*10^6 \pm 1021*10^6$	$1226*10^6 \pm 446*10^6$	0.54**	$2187*10^6 \pm 1473*10^6$	$924*10^6 \pm 313*10^6$	0.42***
Spermidine	$4.7*10^6 \pm 5.5*10^6$	$5.1*10^6 \pm 4.8*10^6$	1.08	$14*10^6 \pm 15*10^6$	$6.8*10^6 \pm 7.6*10^6$	0.49
Phosphoric acid	$24445*10^6 \pm 8726*10^6$	$9730*10^6 \pm 5247*10^6$	0.40***	$23008*10^6 \pm 11674*10^6$	$10250*10^6 \pm 3751*10^6$	0.45**

Identifizierte Metaboliten sind in Tabelle 9 aufgeführt. Das Verhältnis zwischen Behandlung und Kontrolle in Bezug auf die Trockenmasse ist in Abb. 16 aufgeführt. Hier war vor allem der starke Anstieg der Prolinkonzentration nach der Behandlung für beide Genotypen deutlich. Diese Erkenntnis korreliert mit dem Ergebnis der früheren Prolinanalyse (s.o.), in der Prolin ebenfalls in beiden Genotypen anstieg. Zudem war eine Erhöhung der Konzentration für Glycin, Phenylalanin und Saccharose im sensitiven Genotyp nach Stressapplikation von 0,2 M Sorbitol zu beobachten. Alle anderen Metabolite zeigten einen Abfall der Konzentration nach der Stressbehandlung. Genau wie in der proteomischen Untersuchung zeigte der sensitive Genotyp auch hier stärkere Veränderungen.

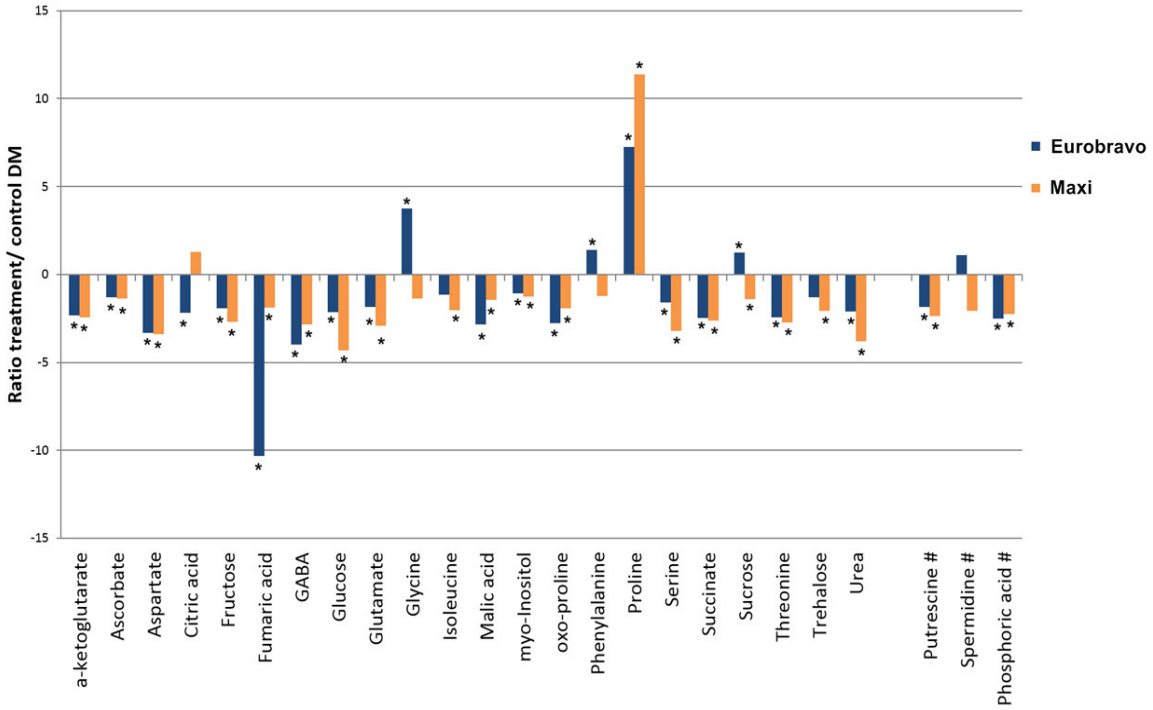


Abbildung 16:Veränderungen der Metabolitkonzentration nach Stressbehandlung mit 0,2 M Sorbitol im Vergleich zur Kontrolle. Verhältnisse basieren auf Werten in µmol/g DM. Verhältnisse unter 1 wurden invertiert um einen Abfall zu zeigen. Blau = sensitiver Genotyp Eurobravo. Orange = toleranter Genotyp Maxi. # = Verhältnis basiert auf Peak Höhe. * = steht für signifikanter Unterschied zwischen Behandlung und Kontrolle.

Um zu überprüfen, ob Pflanzen Sorbitol in diesem experimentellen Setup aufgenommen haben, wurde Kondenswasser aus den Bechern, welches das Medium berührte, gegen die Pflanzenproben verglichen (Abb. 17). Hierbei zeigte sich deutlich, dass das Kondenswasser ebenfalls Sorbitol aufwies, jedoch nur wenn es aus Bechern mit 0,2 M Sorbitol Zusatz stammte. Pflanzenproben wiesen ebenfalls nur Sorbitol auf wenn diese auf Stressmedium kultiviert wurden. Da Kondenswasserproben nur 10-fach verdünnt, die Pflanzenproben jedoch

80-fach verdünnt wurden (auf Grund von hohen Zuckerkonzentrationen), lässt sich schließen, dass eine Aufnahme von Sorbitol unter diesen experimentellen Gegebenheiten wahrscheinlich stattfindet. Dieses wirft die Frage auf, ob Sorbitol das geeignete Osmotikum ist und macht eine Anpassung des Stresssystems erforderlich. Ein Umstieg auf andere Osmotika (PEG), die dann in einem Flüssigkultursystem appliziert werden müssten, und der Stressbeginn nach erfolgter Bewurzelung wären wichtige Optimierungsansätze.

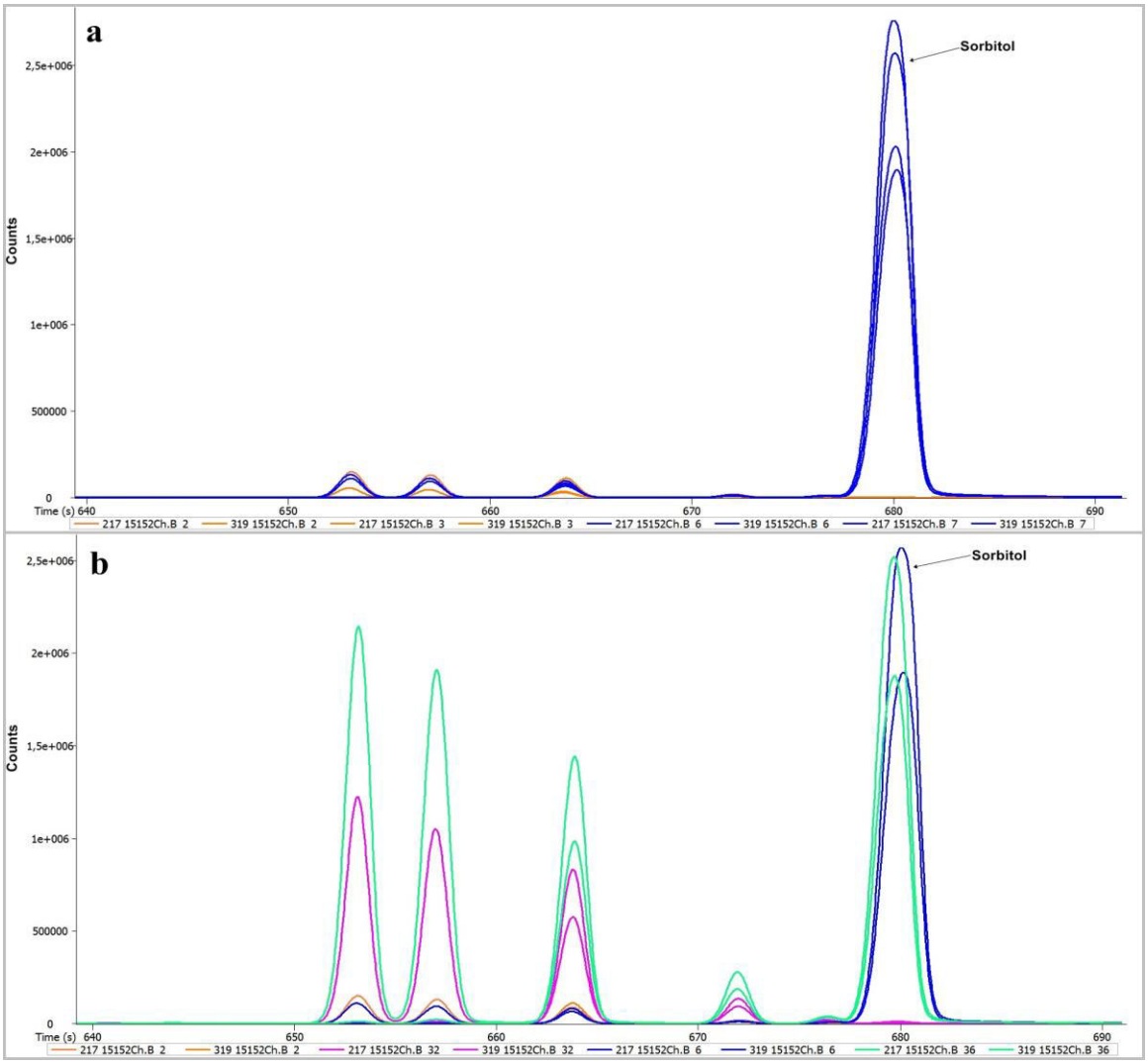
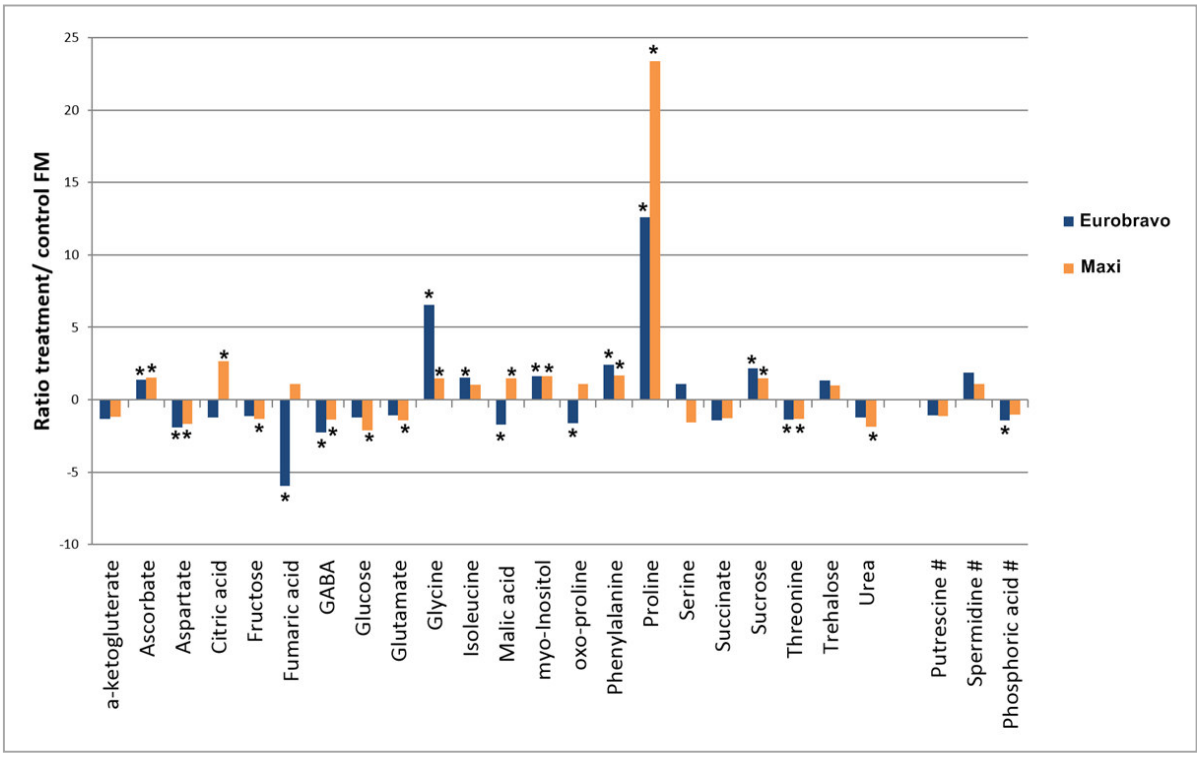


Abbildung 17: Chromatogramme von Kondenswasser aus Bechern mit 0,2 M Sorbitol im Medium und 80-fach verdünnte Pflanzenproben behandelt mit 0,2 M Sorbitol. a = Kondenswasser aus Becher mit Kontrollmedium (2 Proben, orange Linie) und Bechern mit Medium mit 0,2 M Sorbitol (2 Proben, blaue Linie); b = Kondenswasserproben aus Bechern mit und ohne 0,2 M Sorbitol (ohne = orangefarbene Linie, mit = blaue Linie) und Proben von Pflanzen auf Kontrollmedium (pinkfarbene Linie) und Pflanzen auf Medium mit 0,2 M Sorbitol (grüne Linie). 25 µl wurden analysiert.

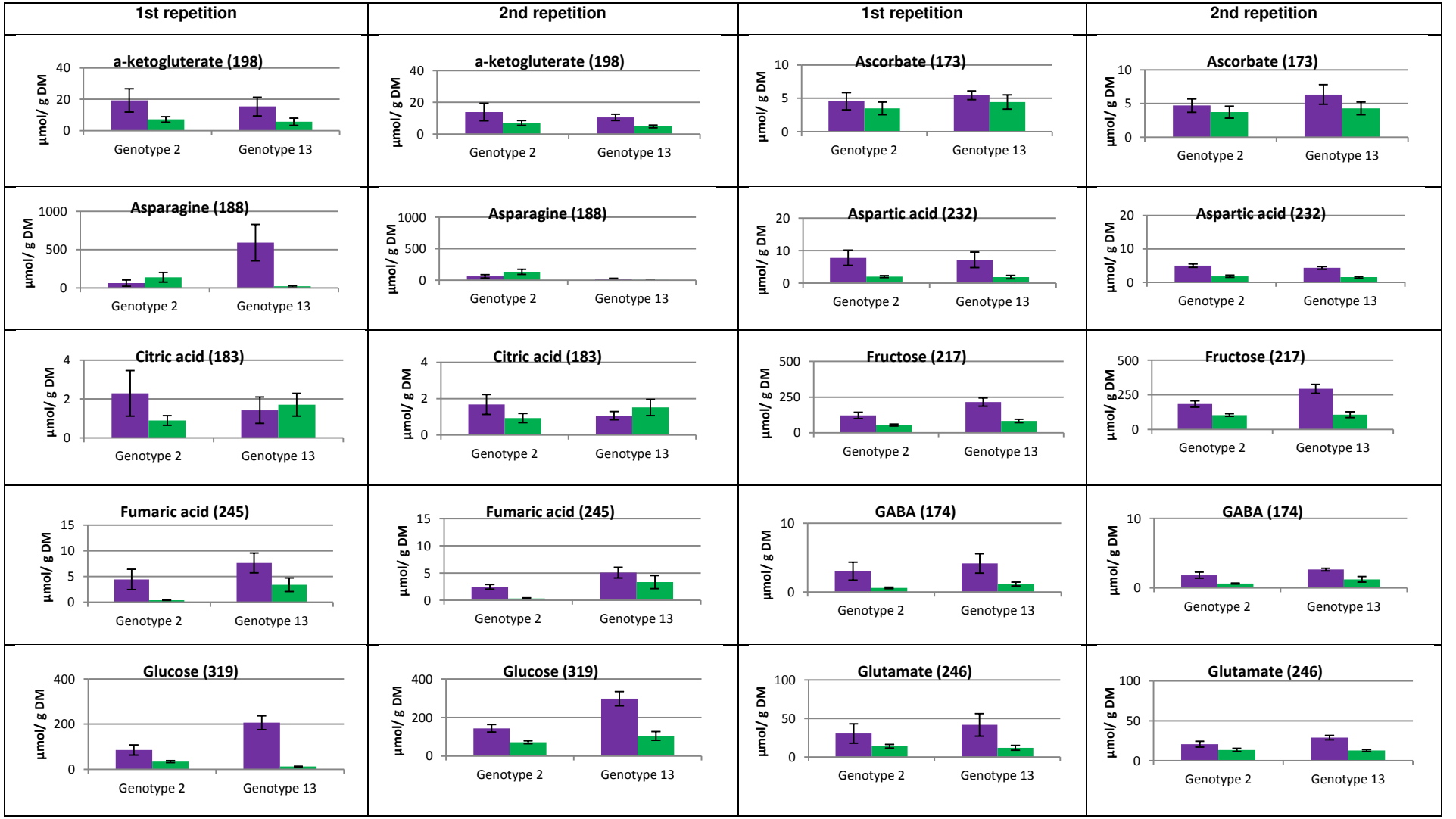
Abschließend ist zu sagen, dass in weiterführenden Schritten überprüft werden sollte, ob auch weitere Genotypen, welche vorher als tolerant oder sensitiv gegenüber osmotischem Stress identifiziert wurden, untersucht werden sollten. Hierfür könnten die Genotypen Eurostarch als eher toleranter und Ramses als eher sensitiver Genotyp gegenüber osmotischem Stress *in vitro* verwendet werden.

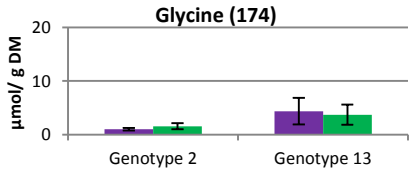
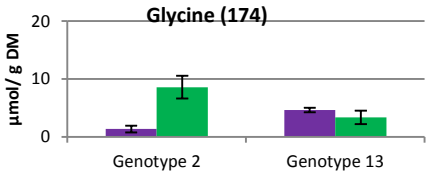
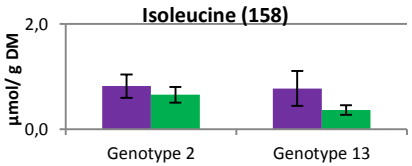
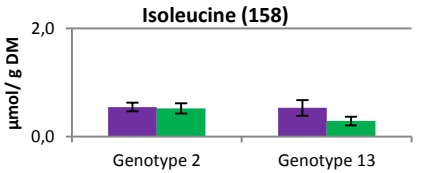
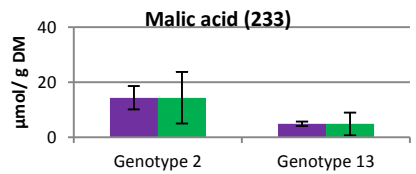
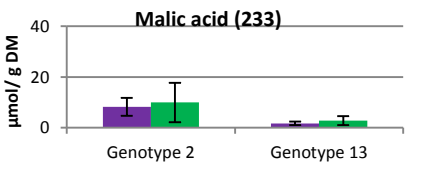
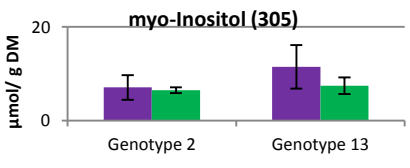
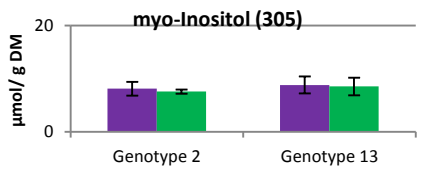
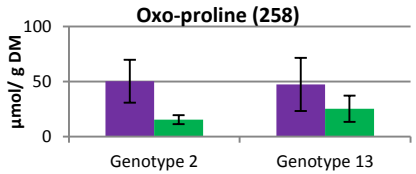
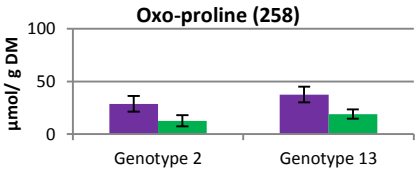
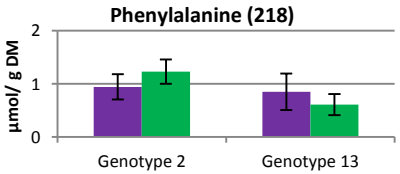
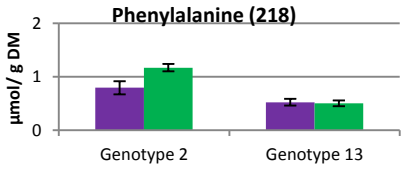
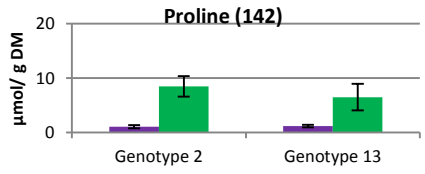
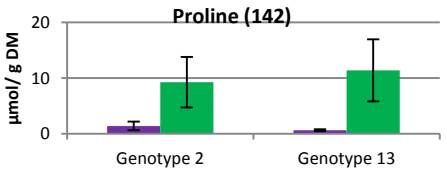
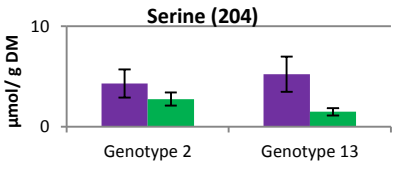
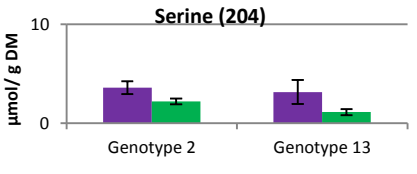
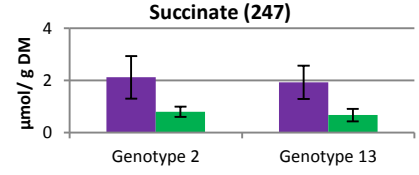
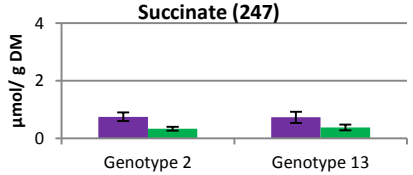
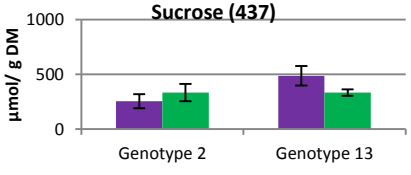
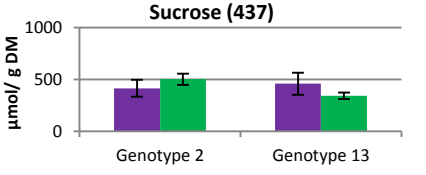
Anhang

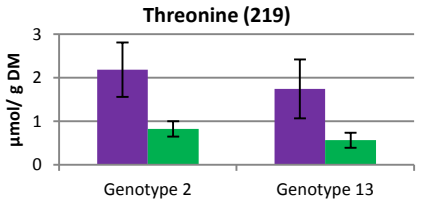
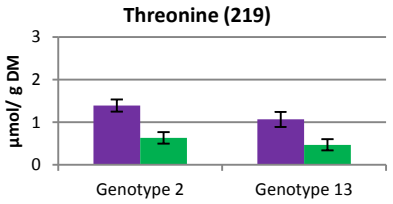
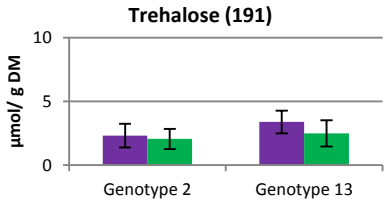
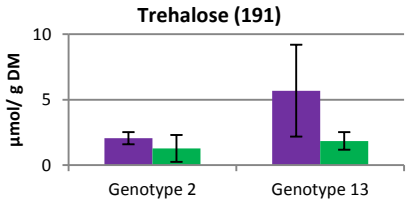
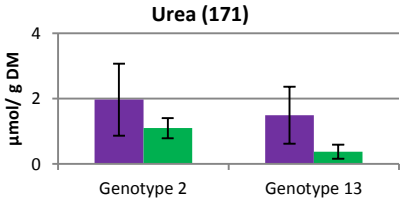
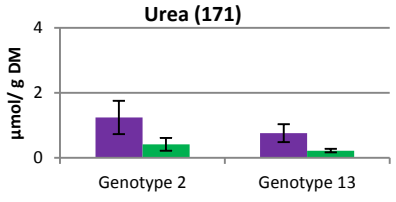
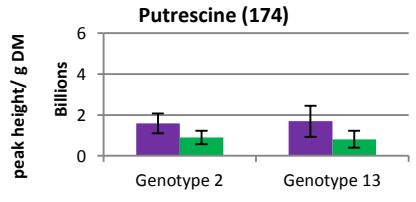
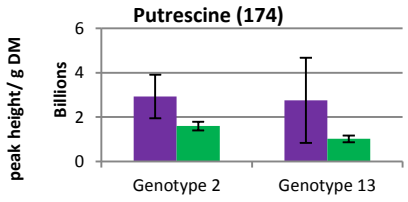
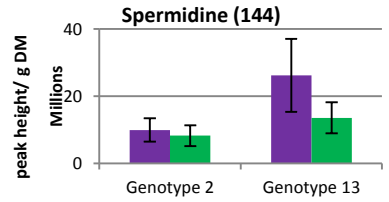
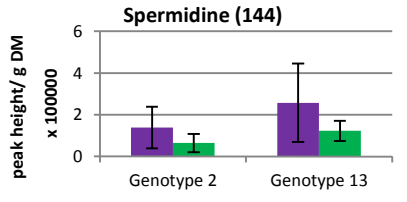
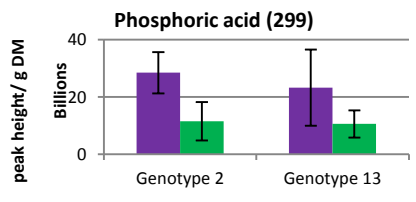
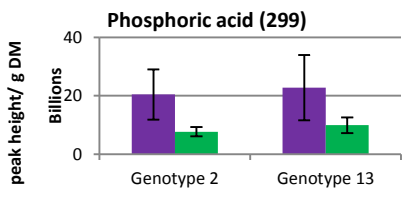


Anhang Abbildung 1. Veränderungen der Metabolitkonzentration nach der Behandlung mit 0,2 M Sorbitol gegenüber der Kontrolle. Verhältnisse basieren auf Werten in µmol/ g FM. Verhältnisse unter 1 wurden invertiert, um eine Abnahme zu zeigen. Blau = sensitiver Genotyp Eurobravo, Orange = toleranter Genotyp Maxi. # = Verhältnis basiert auf Peakhöhe. * = signifikanter Unterschied zwischen Kontrolle und Behandlung.

Anhang Abbildung 2. Metabolitkonzentration oder Peakhöhe im ersten und zweiten Durchlauf des Experiments. Für n Anzahlen siehe Anhang Tabelle 3. Violette Balken zeigen Kontrollen und grüne zeigen Behandlungen mit 0,2 M Sorbitol. Die Zahlen nach dem Namen der Metaboliten stehen für die spezifische Masse, anhand derer die Konzentrationen berechnet wurden. Genotyp 2 = Eurobravo; Genotyp 13 = Maxi.



1st repetition	2nd repetition	1st repetition	2nd repetition
			
			
			
			
			

1st repetition	2nd repetition	1st repetition	2nd repetition
			
			
			
			

Anhang Tabelle 1. Metabolite, welche zur Analyse herangezogen wurden. Für die ersten 36 Metabolite war eine Standardkurve vorhanden basierend auf Reinsubstanzen. Für Substanzen, welche detektierbar waren (markiert mit X), wurde eine Konzentration berechnet.

Metabolite	Detected [A]	Mean RTI [B]	Dilution factor[C]
1. Alanine (190)	No clear peak	-	
2. β-alanine (248)	No clear peak	-	
3. Arginine (142)	Not detected	-	
4. Ascorbate (173)	X	632345	80-fold
5. Asparagine (188)	X	543530	10-fold
6. Aspartic acid (232)	X	477898	10-fold
7. Citric acid (183)	X	617211	10-fold
8. Citrulline (157)	Not calculable	-	
9. Cysteine (220)	Not calculable	-	
10. Dehydroascorbate (303)	No clear peak	-	
11. Fructose (217)	X	639234	80-fold
12. Fumaric acid (245)	X	389288	10-fold
13. GABA (174)	X	484339	10-fold
14. Glucose (319)	X	649283	80-fold
15. Glutamate (246)	X	527613	10-fold
16. Glycine (174)	X	-	10-fold
17. Isocitric acid (245)	Not detected	-	
18. Isoleucine (158)	X	355821	10-fold
19. a-ketoglutarate (198)	X	507304	10-fold
20. Leucine (158)	No clear peak	-	
21. Lysine (174)	Not detected	-	
22. Malic acid (233)	X	-	10-fold
23. Methionine (176)	No clear peak	-	
24. Myo-Inositol (305)	X	727800	10-fold
25. Ornithine (142)	Not detected	-	
26. oxo-Proline (258)	X	483172	10-fold
27. Phenylalanine (218)	X	534187	10-fold
28. Proline (142)	X	360629	10-fold
29. Serine (204)	X	392012	10-fold
30. Shikimic acid (204)	Not calculable	-	
31. Succinate (247)	X	369163	10-fold
32. Sucrose (437)	X	910814	80-fold
33. Threonine (218)	X	405870	10-fold
34. Trehalose (191)	X	945781	250 µl
35. Urea (171)	X	328515	10-fold
36. Valine (144)	No clear peak	-	10-fold
37. Putrescine (174)	X (relative value)•	583255	10-fold
38. Spermidine (144)	X (relative value)	790581	250 µl
39. Spermine (144)	Not detected	-	
40. Phosphoric acid (299)	X (relative value)	332260	10-fold
41. Tyrosine (280)	Not detected	-	
42. Raffinose (437)	Not detected	-	

A= Overview of detected samples from the test set.

X: Detected and concentration calculated

No clear peak: No clear peak could be matched to the substance, calculation was not possible

Not detected: Substance was not detectable in the sample.

Not calculable: The R^2 for two masses of these substances were below 0.900. Therefore these substances were not considered as a pure peak (see Supplementary table 4 for R^2 values).

X (relative value): No standard curve was available for this substance, therefore values are given as peak height.

•: The R^2 value for the metabolite was lower than 0.900 in one of the comparisons; calculations are made based on all measurements, but should be handled with care.

B = Mean retention time index (RTI) over all chromatograms for the given substance.

C= Volume analysed for the compound. 250 µl = original volume. 10-fold = 10-fold dilution of the 250 µl and 80-fold = 80-fold dilution of the 250 µl

Anhang Tabelle 2. Mittelwerte mit Standardabweichungen der detektierten Metabolite in µmol/ g FM in Sprossproben nach 11 Tagen auf Medium mit und ohne 0,2 M Sorbitol. Das Verhältnis zwischen der Behandlung und der Kontrolle ist dargestellt. Sternchen hinter dem Verhältnis stehen für signifikante Unterschiede zwischen Behandlung und Kontrolle (* ≤ 0.001, ** ≤0.01, *≤ 0.05). Für Putrescin, Spermidin und Phosphorsäure wurde die Peakhöhe über alle Proben berechnet. Grün = höher abundant nach Stress; orange = geringer abundant nach Stress; gelb = signifikanter Unterschied zwischen den Genotypen. n = Anhang Tabelle 3 für individuelle n Anzahlen.**

	Sensitive genotype			Tolerant genotype		
	Control [a] Mean ± SD	0.2 M sorbitol [b] Mean ± SD	Ratio Stress:control	Control Mean ± SD	0.2 M sorbitol Mean ± SD	Ratio Stress:control
alpha-ketoglutarate (198)	1.53± 0.64	1.14± 0.26	0.75	1.01± 0.38	0.85± 0.28	0.84
Ascorbate (173)	0.43± 0.10	0.58± 0.14	1.36***	0.46± 0.09	0.70± 0.16	1.52***
Asparagine(188)	5.84± 3.07**	21.71± 8.38***	3.72***	25.44± 26.37	1.89±1.93	0.07***
Aspartate (232)	0.59± 0.20	0.31± 0.05	0.52***	0.45± 0.17	0.27± 0.07	0.61***
Citric acid (183)	0.18± 0.09**	0.15 ± 0.04**	0.80	0.10± 0.04	0.26± 0.08	2.65***
Fructose (217)	14.02± 3.57	12.58± 4.23	0.90	19.79± 3.90	15.12± 3.20	0.76**
Fumaric acid (245)	0.32± 0.16	0.05± 0.02***	0.17***	0.50± 0.16	0.54± 0.20	1.08
GABA (174)	0.22± 0.10	0.10± 0.01	0.44***	0.27± 0.10	0.19± 0.05	0.72*
Glucose (319)	10.55± 3.31***	8.52± 3.21	0.81	19.65± 4.45	9.35± 7.93	0.48***
Glutamate (246)	2.35± 0.95	2.19 ± 0.34	0.93	2.78± 0.96	1.96± 0.37	0.70**
Glycine (174)	0.11± 0.05***	0.72± 0.27	6.53***	0.38±0.29	0.56± 0.24	1.50**
Isoleucine (158)	0.06± 0.02	0.09 ± 0.02***	1.53***	0.05± 0.02	0.05± 0.01	1.02
Malic acid (233)	1.02 ± 0.46	0.59 ± 0.20***	0.57**	0.93± 0.35	1.37± 0.51	1.47**
myo-Inositol (305)	0.70± 0.19	1.12± 0.12	1.61***	0.79± 0.28	1.28± 0.28	1.62***
oxo-proline (258)	3.64± 1.66	2.27± 0.76*	0.63**	3.31± 1.40	3.55± 1.47	1.07
Phenylalanine (218)	0.08± 0.02	0.19± 0.03***	2.41***	0.05± 0.02	0.09± 0.02	1.67***
Proline (142)	0.11± 0.06*	1.42± 0.54	12.60***	0.07± 0.03	1.58± 0.92	23.36***
Serine (204)	0.36± 0.10	0.40± 0.09	1.10	0.33± 0.14	0.21± 0.06	0.64
Succinate (247)	0.13± 0.08	0.09± 0.04	0.70	0.11± 0.06	0.08± 0.04	0.79
Sucrose (437)	30.74± 10.07	66.68± 17.37	2.17***	36.79± 7.50	54.03± 4.72	1.47***
Threonine (219)	0.16± 0.06	0.12± 0.03	0.72*	0.11± 0.05	0.08± 0.02	0.75*
Trehalose (191)	0.20± 0.07	0.27± 0.15	1.35	0.35± 0.20	0.35± 0.14	1.00
Urea (171)	0.15 ± 0.08*	0.12± 0.07***	0.82	0.09± 0.06	0.05± 0.03	0.54**
Putrescine (174)	$208*10^6$± $94*10^6$	$196*10^6$±$71*10^6$	0.94	$165*10^6$± $114*10^6$	$148*10^6$± $50*10^6$	0.90
Spermidine (144)	$0.4*10^6$± $0.5*10^6$	$0.8*10^6$± $0.7*10^6$	1.88	$1.0*10^6$± $1.2*10^6$	$1.1*10^6$± $1.2*10^6$	1.06
Phosphoric acid (299)	$2249*10^6$± $803*10^6$	$1557*10^6$± $840*10^6$	0.69*	$1718*10^6$± $921*10^6$	$1640*10^6$± $600*10^6$	0.95

a = Asterisks display significant difference between the control of the sensitive and the control of the tolerant genotype (*** ≤ 0.001, ** ≤0.01, *≤ 0.05) For putrescine, spermidine and phosphoric acid the difference was calculated based on the peak height over all samples.

b = Asterisks display significant difference between the treated plants of the sensitive and the plants treated with 0.2 M sorbitol of the tolerant genotype (*** ≤ 0.001, ** ≤0.01, *≤ 0.05). For putrescine, spermidine and phosphoric acid the difference was calculated based on the peak height over all samples.

Anhang Tabelle 3. R² Werte für all identifizierten Metaboliten im ersten und zweiten Durchgang des Experiments. R² basiert auf spezifischen Massen, welche in Klammern hinter den Metaboliten gezeigt werden. Unterstrichene Nummern zeigen die spezifische Masse an, auf der die nachfolgende Kalkulation beruht. Rote Nummer zeigen geringe R² Werte an. n = 8 wenn nicht anders angegeben.

Metabolite	Eurobravo				Maxi			
	1st repetition		2nd repetition		1st repetition		2nd repetition	
	Control	Treatment	Control	Treatment	Control	Treatment	Control	Treatment
α-ketoglutarate (198/288)	0.993	0.995	0.990	0.911 (n = 7)	0.951	0.960	0.923	0.960
Ascorbate (173/157)	0.984	0.998	0.995	0.994	0.994	0.996	0.994	0.979
Asparagine (188/216)	0.998	0.998 (n = 7)	0.999	0.999	0.968 (n = 7)	0.998	0.934	0.997
Aspartate (232/218)	0.999	0.999	0.999	0.993 (n = 7)	0.998	0.998	0.991	0.999
Citric acid (183/273)	0.997	0.955	0.985	0.992 (n = 7)	0.980	0.980	0.963	0.997
Fructose (217/307)	0.998	0.999	0.998	0.999	0.999	0.999	0.998	0.999
Fumaric acid (245/143)	0.977	0.904 (n = 7)	0.975 (n = 7)	0.987 (n = 7)	0.912	0.986	0.980	0.984
GABA (174/304)	0.989	0.925	0.957	0.982	0.932	0.975 (n=7)	0.970	0.997 (n = 7)
Glucose (319/160)	0.997	0.995	0.998	0.999	0.999	0.997	0.997	0.999
Glutamate (246/363)	0.998	0.995	0.996	0.995 (n = 7)	0.948	0.976	0.996 (n = 7)	0.991
Glycine(174/248)	0.909 (n = 7)	0.935 (n = 7)	0.991	0.983 (n = 7)	0.953	0.919 (n = 7)	0.995	0.997
Isoleucine (158/232)	0.989 (n = 7)	0.936	0.943	0.977 (n = 7)	0.971	0.929 (n=7)	0.967	0.968
Malic acid (233/245)	0.999	0.999	0.999	0.998	0.999	0.999	0.998	0.999
Myo-Inositol (305/265)	0.999	0.998	0.999	0.998 (n =7)	0.996	0.993	0.984	0.999
Oxo-proline (258/156)	0.993	0.971	0.927	0.982	0.964	0.951	0.948	0.995
Phenylalanien (218/192)	0.999	0.999	0.992	0.999 (n = 7)	0.994	0.995	0.987	0.997
Proline (142/216)	0.998 (n=7)	0.908	0.990	0.941	0.968 (n = 7)	0.993	0.994	0.996
Serine (204/218)	0.999	0.997	0.999	0.998 (n = 7)	0.993	0.997	0.986	0.999
Succinate (247/172)	0.995	0.958	0.900	0.928 (n = 7)	0.912	0.982	0.992 (n = 7)	0.969
Sucrose (437/361)	0.999	0.993	0.996	0.993	0.998	0.992	0.997	0.988
Threonine (219/291)	0.997	0.989	0.986	0.980 (n = 7)	0.973	0.978 (n = 7)	0.980 (n = 7)	0.986
Trehalose (191/361)	0.978	0.994	0.978 (n = 7)	0.992	0.990	0.987	0.990	0.989
Urea (171/189)	0.983	0.959 (n = 7)	0.997	0.976 (n = 7)	0.994	0.986	0.955 (n = 7)	0.972 (n = 7)
No quantification (low R² values; low n numbers)								
Putrescine (174/361)	0.970	0.898	0.900	0.943 (n = 7)	0.909 (n = 7)	0.968	0.855	0.941
Spermidine (144/174)	0.951 (n = 7)	0.997	0.979	0.998 (n = 5)	0.968	0.998	0.962	0.995
Phosphoric acid (299/211)	0.985	0.991	0.988	0.977 (n = 7)	0.973 (n = 6)	0.929	0.927	0.935

Arbeitspaket 5: Analyse von schnellen Änderungen im Wurzelproteom

Das Arbeitspaket 5 wurde in der Abteilung des IPK Gatersleben von Frau Anna Jozefowicz durchgeführt. Eine Bereitstellung von Wurzelmaterial aus *in vitro* Versuchen bezüglich osmotischem Stress der LUH, um die schnellen Veränderungen im Wurzelproteom untersuchen zu können, wurde nicht benötigt.

Arbeitspaket 6: Informationsaustausch, Auswahl der Genotypen für das Testsortiment, Wissenstransfer

Auf insgesamt 6 Projekttreffen wurden die Genotypen für die Experimente festgelegt und die erzielten Ergebnisse besprochen. Hierbei lag ein spezieller Fokus auf den zu verwendenden Methoden, welche eine Vergleichbarkeit der erzielten Ergebnisse mit sich führte. Die gute Kooperation über die Dauer des Projektes soll speziell in gemeinsamen Publikationen zum Ausdruck kommen. Eine Publikation ist bereits erschienen (Bündig et al. 2016), eine weitere befindet sich im Begutachtungsprozess.

2. Verwertung

- *der voraussichtliche Nutzen, insbesondere der Verwertbarkeit des Ergebnisses im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans*
- *Wissenschaftliche und/oder technische Erfolgsaussichten nach Projektende bzw. Aussichten für eine mögliche notwendige nächste Phase bzw. die nächsten innovatorischen Schritte zur erfolgreichen Umsetzung der Ergebnisse*
- *wirtschaftliche Erfolgsaussichten*

Die erzielten Ergebnisse lassen eine nächste Phase zur Validierung der Ergebnisse anhand des Materials aus dem Rainout-Shelter dringend notwendig erscheinen, um eventuelle Artefakte, die auf das *In-vitro*-Testsystem zurückgehen, auszuschließen. Interessante Proteine konnten identifiziert werden, welche nach weiterer Testung, in anschließenden Schritten als Biomarker fungieren könnten. Deren funktionale Testung ist zuvor aber notwendig. Der Zeithorizont für deren Einsatz in der Züchtung liegt bei etwa 5 Jahren.

Nächste Schritte sollten eine Anpassung des *In-vitro*-Testsystems einbeziehen, um die eher allmähliche Austrocknung des Bodens im Feld noch besser zu simulieren. Hierfür wurde ein Flüssigkultursystem etabliert, das nun zur Verfügung steht. Die Testung weiterer Genotypen innerhalb einer Zeitreihe insbesondere mit Testung der frühen Stressreaktionen zwischen Tag 1 bis 7 nach der Stressapplikation sollten weitere Einblicke in die Reaktionen von sensitiven bzw. toleranten Stärkekartoffeln geben.

Besonders interessant erscheint das Ergebnis, dass Sorbitol vermutlich aus dem Medium von den Stärkekartoffeln aufgenommen wird. Dieses sollte weiter untersucht werden, da Sorbitol als Osmotikum in vielen Studien verwendet wurde, um Kartoffeln *in vitro* zu Stress auszusetzen. Hierbei sollte besonders getestet werden, ob Sorbitol auch von intakten Wurzeln aufgenommen wird. Zudem stellte sich in unseren Untersuchungen heraus, dass die *In-vitro*-Kultur an sich schon mit erhöhtem Stress für die Pflanzen verbunden ist. Daher ist eine weitere Phase des Projekts notwendig, um die erzielten Ergebnisse zu validieren und das Testsystem weiter zu optimieren, bevor weitere Anwendungen/Nutzungen erfolgen können.

3. Erkenntnisse von Dritten

- *während der Durchführung des Vorhabens dem ZE bekannt gewordener Fortschritt auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen*

Es sind keine Fortschritte bekannt geworden.

4. Veröffentlichungen

- *die erfolgten oder geplanten Veröffentlichungen des Ergebnisses*

Derzeit sind drei Veröffentlichungen im Rahmen der Ergebnisse geplant:

1. Bündig, C., Vu, T.H., Schum, A., Meise, P., Seddig, S. und T. Winkelmann: Variability in osmotic stress tolerance of starch potato genotypes (*S. tuberosum* L.) as revealed by an *in vitro* screening: Role of proline, osmotic adjustment and drought response in pot trials.
   Derzeitiger Status: Eingereicht bei Journal of Agronomy and Crop Science.

2. Bündig, C., Blume, C., Peterhänsel, C. und T. Winkelmann: Changed composition of metabolites in *Solanum tuberosum* subjected to osmotic stress in vitro. Is sorbitol taken up?
   Derzeitiger Status: Eingereicht bei Plant Cell Tissue and Organ Culture.

Bereits akzeptiertes Manuskript (wird dem Bericht beigelegt):

3. Christin Bündig, Anna Maria Jozefowicz, Hans-Peter Mock und Traud Winkelmann. Proteomic analysis of two divergently responding potato genotypes (*Solanum tuberosum* L.) following osmotic stress treatment *in vitro*., Journal of Proteomics (2016), http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2016.04.048

Ebenfalls ist ein Methodenpaper hinsichtlich der in diesem Projekt etablierten Flüssigkulturen geplant, welches sich jedoch noch in der Vorbereitungsphase befindet.

Eine populärwissenschaftliche Publikation aller Projektpartner ist in der Zeitschrift Kartoffelbau erschienen:

SCHUM, A., MEISE, P., SEDDIG, S., JOZEFOWICZ, A., MOCK, H.-P., BUENDIG, C. UND T. WINKELMANN (2016): Trocken- und Stickstoffmangel-Stressreaktionen der Stärkekartoffel. Untersuchungen auf morphologischer, physiologischer und proteomischer Ebene im Projekt PROKAR. Kartoffelbau 67: 40-45

Frau Christin Bündig, die Projektbearbeiterin hat am 27.5.2016 mit der Note „sehr gut“ ihre Promotion abschlossen. Die Arbeit ist also auch ein Ergebnis des Projekts, sie trägt den Titel: Response of starch potatoes (*Solanum tuberosum* L.) to osmotic stress *in vitro* regarding growth, proteome and metabolite profile. Wir sind der FNR, insbesondere unserer Sachbearbeiterin Frau Dr. F. Urban, sehr dankbar für die Betreuung und dem Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft für die Förderung.

Hannover, 12.06.2016

Prof. Dr. Traud Winkelmann