

Molekulare und physiologische Charakterisierung der Überlebensstrategien von Wildpflanzen der Brassicaceae bei Überflutung

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades Doktorin der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht an der

Fakultät für Biologie, Chemie und Geowissenschaften der Universität Bayreuth

von

Jana Theresa Müller

geboren am 13.08.1990 in Naila

Bayreuth, Februar 2020

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von März 2015 bis Februar 2020 in Bayreuth am Lehrstuhl Pflanzenphysiologie unter Betreuung von Frau Professor Dr. Angelika Mustroph angefertigt.

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Biologie, Chemie und Geowissenschaften der Universität Bayreuth genehmigten Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades einer Doktorin der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.).

Dissertation eingereicht am: 04.02.2020

Zulassung durch die Promotionskommission: 12.02.2020

Wissenschaftliches Kolloquium: 23.07.2020

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Matthias Breuning

Prüfungsausschuss:

Prof. Dr. Angelika Mustroph	(Erstgutachterin)
-----------------------------	-------------------

Prof. Dr. Stephan Clemens (Zweitgutachter)

Prof. Dr. Stefan Heidmann (Vorsitz)

Prof. Dr. Bettina Engelbrecht

Teile dieser Arbeit wurden in dem Artikel

"Keeping the shoot above water – submergence triggers antithetical growth responses in stems and petioles of watercress (*Nasturtium officinale*)"

Müller, J. T., van Veen, H., Bartylla, M. M., Akman, M., Pedersen, O., Sun, P., Schuurink, R. C., Takeuchi, J., Todoroki, Y., Weig, A. R., Sasidharan, R. & Mustroph, A. (2019). *New Phytologist*, doi:10.1111/nph.16350

veröffentlicht.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzui	ngsverzeichnisIV
Zusamm	enfassungVII
Summary	/IX
1. Einle	itung1
1.1	Überflutung ist ein komplexer Stress für Landpflanzen1
1.2	Veränderte Genexpression bei Hypoxie und Sauerstoffwahrnehmung
1.3	Aquatische Organismen nutzen Hydrogencarbonat zur Unterwasser-Photosynthese5
1.4	Anpassungen und Überlebensstrategien von Landpflanzen bei Überflutung
1.4.1	Strategien zur Verbesserung des Unterwasser-Gasaustauschs6
1.4.2	Anpassungen zur Verbesserung der inneren Belüftung8
1.4.3	Gegensätzliche Wachstumsreaktionen: Vermeidungs- und Durchhaltestrategie9
1.5	Einfluss von Phytohormonen auf morphologische Anpassungen11
1.5.1	Die hormonelle Triade aus Ethylen, Abscisinsäure und Gibberellinsäure
1.5.2	Die Wachstumsregulatoren Auxin und Brassinosteroide14
1.6	Analyse von Wildpflanzen als Grundlage zur Erzeugung von toleranten Nutzpflanzen 16
1.7	Zielsetzung17
2. Mat	erial und Methoden19
2.1	Organismen und Plasmide
2.2	Chemikalien
2.3	Nährstoffmedien
2.4	Bakterienanzucht
2.4.1	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> Zellen20
2.4.2	Herstellung kompetenter A. tumefaciens Zellen
2.4.3	Transformation von Bakterien21
2.5	Pflanzenanzucht und Pflanzentransformation
2.5.1	Wachstumsbedingungen und Zusammensetzungen der Erde21
2.5.2	Anzucht aus Samen in Sterilkultur22
2.5.3	Vegetative Propagation22
2.5.4	Stabile Pflanzentransformation mit A. tumefaciens22
2.5.5	Kallus- und Sprossinduktion23
2.6	Stressbehandlungen23
2.6.1	Überflutungsbedingungen23
2.6.2	Nachweis der Überlebensstrategie23
2.6.3	Überleben nach Überflutung23
2.6.4	Behandlung mit Phytohormonen und deren Inhibitoren24
2.6.5	Messung des Sauerstoffgehalts und der Dunkelatmung
2.7	Molekularbiologische und analytische Methoden25
2.7.1	Isolierung von genomischer DNA aus Pflanzenmaterial
2.7.2	Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien25
2.7.3	Isolierung von Gesamt-RNA aus Pflanzenmaterial25

	2.7.4	cDNA-Synthese aus Gesamt-RNA	26
	2.7.5	Probenvorbereitung für Gesamt-Transkriptom-Shotgun-Sequenzierung (RNA-seq)	26
	2.7.6	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	27
	2.7.7	Agarose-Gelelektrophorese	29
	2.7.8	DNA-Aufreinigung und Sequenzierung	29
	2.7.9	Gateway-Klonierung und Restriktionsverdau	29
	2.7.10	D Bestimmung von Zucker- und Stärkegehalten	30
	2.7.11	Bestimmung des ABA-Gehalts aus Pflanzenmaterial	30
	2.7.12	2 Messung der ADH-Aktivität und Proteinbestimmung nach Bradford	31
	2.7.13	3 SDS-PAGE und Western-Blot	31
	2.8	Bioinformatische Auswertung der RNA-seq Daten	33
	2.8.1	Referenztranskriptome	33
	2.8.2	Differenzielle Genanalyse, Gene Ontology-Analyse und Clustering	33
	2.9	Verwendete Webtools	34
	2.10	Statistische Auswertung	34
2	Frack	nicco	25
	2 1	Charakterisierung der Überflutungsreaktionen von Dflanzen der Prassisasse Familie	25
	211	Überflutung führt zu artensnezifischen Wachstumsreaktionen	25
	212	Überlehensevneriment offenhart Unterschiede in der Überflutungsteleranz	
	2.1.2	Identifiziorung melekularer Mechanismen bei Überflutung mittels PNA sog	
	2.2 2.2	Kontrastierende Wachstumsstrategien in N. officingle hei Überflutung	40
	221	Überflutung führt zu gewebespezifischen und gewebeupspezifischen Peaktionen	41
	2.2.1	Überflutung vorursacht orbabliche Voränderungen des Transkrintems	41
	3.3.2	Identifiziorung von Beforenzgenen zur Transkriptnermalicierung	45 E0
	5.5.5 2 2 A	Überflutungsinduziertes Stängelwachstum setzt ABA Abbau veraus	
	3.3.4 2.2 E	Ethylon beginflusst die Unterwasser Washetumsreaktionen nur geringfügig	52
	2.2.2	Die gegensätzlichen Wachstumsreaktionen worden nicht durch GA bervorgerufen	
	5.5.U 2 2 7	Bungerische Pedingungen troten nur bei Überflutung in Dunkelbeit auf	50
	220	Brassingsteroide sind nicht an den gewehesnezifischen Beaktionen beteiligt	62
	3.3.0	Der Einfluss von Auxin auf die gegensätzlichen Wachstumsreaktionen bleibt unklar	63
	3.3.5	Identifizierung von Mechanismen der Überflutungstoleranz	05
	3. 4 3./1	Zusammenhang zwischen Überflutungstoleranz und Änderungen im Stoffwechsel	05
	3/12	Differenzielle Genanalyse bei Überflutung in den sensitiven und toleranten Arten	05
	3/13	Kohlenhydratmangel-assozijerte Gene sind in den sensitiven Arten stärker induziert	
	344	Überflutung im Licht ruft keine transkrintionelle Antwort auf Hypoxie bervor	05
	3/15	GO-Analyse zur Identifizierung von überflutungsresnonsiven Prozessen	7 2
	346	Die allgemeine Üherflutungsantwort heinhaltet Stressreaktionen	/ 4
	317	Molekulare Überflutungsmechanismen der sensitiven Arten	70
	2/10	Molekulare Überflutungsmechanismen der teleranten Arten	70
	3.4.0	Rorinna-snezifische Üherflutungsmechanismen	ور 21
	2/10	BCA3 als Kandidatengen für Überflutungstoleranz in <i>P</i> sulvestris	נע. גע
	2 / 11	BCA3 liberevoression führt zu keiner erhöhten Überflutungstelerenz in A theliane	02 QE
	2/11	\sim Möglichkeiten zur Insktivierung von $PcPCA2$ und anderen Carboanbudrasen	נט דס
	5.4.12		

4.	Disku	ussion
	4.1	Von der Natur lernen – Modell- und Wildpflanzen als Forschungsgrundlage
	4.2	Analyse überflutungsresponsiver Mechanismen durch RNA-seq91
	4.3	Gegensätzliche Wachstumsstrategien bei N. officinale92
	4.3.1	Gewebeunspezifische Reaktionen sind mit Stoffwechseländerungen assoziiert92
	4.3.2	Transkriptionelle Regulation der Wachstumsunterdrückung in den Petiolen93
	4.3.3	ABA-Abbau ist der entscheidende Faktor für das Stängelwachstum unter Wasser94
	4.3.4	Das Unterwasser-Stängelwachstum ist nicht hauptsächlich durch Ethylen induziert95
	4.3.5	Das überflutungsinduzierte Stängelwachstum wird nicht durch GA vermittelt96
	4.3.6	Die Unterwasser-Elongation wird vermutlich durch circadiane Rhythmik gesteuert97
	4.3.7	Auxin und BRs sind nicht eindeutig an den Wachstumsreaktionen beteiligt98
	4.3.8	Welche anderen Faktoren könnten die Wachstumsreaktionen beeinflussen?99
	4.4	Multispezies-Vergleich zur Identifizierung von Toleranzmechanismen100
	4.4.1	Zusammenhang zwischen Primärstoffwechsel und Überflutungstoleranz101
	4.4.2	Reaktionen auf biotischen Stress sind unabhängig von der Überflutungstoleranz103
	4.4.3	Einfluss von Trockenstress und Metallstress auf die Überflutungstoleranz105
	4.4.4	Oxidativer Stress während der Überflutung und in der Regenerationsphase106
	4.4.5	Carboanhydrasen und Unterwasser-Photosynthese als Toleranzfaktoren?107
	4.4.6	Alternative Mechanismen der Überflutungstoleranz in der Gattung Rorippa108
	4.5	Ausblick
5.	Litera	aturverzeichnis112
6.	Anha	ang137
	6.1	Abbildungen
	6.2	Tabellen144
	6.3	Daten
Da	anksagu	ıng150
(Ei	idessta [:]	ttliche) Versicherungen und Erklärungen152

Abkürzungsverzeichnis

1-MCP	1-Methylcyclopropen
2,4-D	2,4-Dichlorphenoxyessigsäure
ABA	Abscisinsäure
Abz-E3M	Abscinazole-E3M
ACC	1-Aminocyclopropan-1-carbonsäure
ADH	Alkoholdehydrogenase
AGI	Arabidopsis Genome Initiative
AlaAT	Alanin-Aminotransferase
ANOVA	Varianzanalyse (analysis of variance)
ATP	Adenosintriphosphat
AVG	Aminoethoxyvinylglycin
BCA	β -Carboanhydrase
BCAA	verzweigtkettige Aminosäuren (branched-chain amino acids)
BL	Brassinolid
BLASTN	Nukleotid-BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)
bp	Basenpaar
BRs	Brassinosteroide
BRZ	Brassinazole
CBB	Coomassie-Brillantblau
cDNA	komplementäre DNA
CDK	Cyclin-abhängige Kinasen
CDS	codierende Sequenz
CIM	Kallusinduktionsmedium
Col-0	Columbia
C-term.	Carboxy-terminal
CT	Schwellenwertzyklus (cycle threshold)
DEGs	differenziell exprimierte Gene
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EXPs	Expansine
FW	Frischgewicht
GA	Gibberellinsäure
gDNA	genomische DNA
GO	Gene Ontology
GVII ERF	Gruppe VII Ethylene Response Factor
HA	Hämagglutinin
HRG	Hypoxie-responsives Gen
HSD	honestly significant difference
HSF	Hitzestress-Transkriptionsfaktor (heat stress transcription factor)
IAA	Indol-3-essigsäure
IPA	Indol-3-pyruvat
IPMI	ISOPROPYLMALATE ISOMERASE
JA	Jasmonsäure
kb	Kilobase
log ₂ FC	log₂ fold change
mRNA	messenger-RNA
NAA	1-Naphthylessigsäure
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NPA	Naptalam
N-term.	Amino-terminal

OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600 nm
PAC	Paclobutrazol
PDC	Pyruvatdecarboxylase
РСО	PLANT CYSTEIN OXIDASE
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PMEs	Pektinmethylesterasen
PRT	PROTEOLYSIS
qRT-PCR	quantitative Echtzeit-PCR (quantitative real-time PCR)
RAP2	RELATED TO APETALA2
RNAi	RNA-Interferenz
ROL	radial oxygen loss
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RT	reverse Transkription / reverse Transkriptase
RuBisCO	Ribulose-1,5-bisphosphat-carboxylase/-oxygenase
SA	Salicylsäure
SAM	S-Adenosylmethionin
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SUB1A	SUBMERGENCE1A
SURFs	submergence up-regulated families
T-DNA	Transfer-DNA
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	Transfer-RNA
ÜN	über Nacht
XTHs	Xyloglucan-Endotransglucosylase/Hydrolasen

Liste der Organismen, die mehr als dreimal im Fließtext erwähnt werden und deren Abkürzung.

Name	Abkürzung
Arabidopsis thaliana	A. thaliana
Cardamine hirsuta	C. hirsuta
Cardamine pratensis	C. pratensis
Hygrophila difformis	H. difformis
Nasturtium officinale	N. officinale
Rorippa amphibia	R. amphibia
Rorippa palustris	R. palustris
Rorippa sylvestris	R. sylvestris
Rumex acetosa	Ru. acetosa
Rumex palustris	Ru. palustris
Oryza sativa	Reis
Agrobacterium tumefaciens	A. tumefaciens
Escherichia coli	E. coli

Abkürzung	Name	AGI
ACO1	ACC OXIDASE 1	AT2G19590
ACS7	1-AMINO-CYCLOPROPANE-1-CARBOXYLATE SYNTHASE 7	AT4G26200
ADH1	ALCOHOL DEHYDROGENASE 1	AT1G77120
ARL	ARGOS-LIKE	AT2G44080
ASN1/DIN6	GLUTAMINE-DEPENDENT ASPARAGINE SYNTHASE1/ DARK INDUCIBLE 6	AT3G47340
BBX30	B-BOX DOMAIN PROTEIN 30	AT4G15248
BCA3	BETA CARBONIC ANHYDRASE 3	AT1G23730
BCAT-2	BRANCHED-CHAIN AMINO ACID TRANSAMINASE 2	AT1G10070
CBP20	CAP-BINDING PROTEIN 20	AT5G44200
CP57	CYCLOPHILIN 57	AT4G33060
CYP707A1	CYTOCHROME P450, FAMILY 707, SUBFAMILY A, POLYPEPTIDE 1	AT4G19230
СҮР707А2	CYTOCHROME P450, FAMILY 707, SUBFAMILY A, POLYPEPTIDE 2	AT2G29090
DIN10	DARK INDUCIBLE 10	AT5G20250
ECS1		AT1G31580
GA20ox2	GIBBERELLIN 20 OXIDASE 2	AT5G51810
GA3ox1	GIBBERELLIN 3 OXIDASE 1	AT1G15550
GLB1	CLASS I HEMOGLOBIN	AT2G16060
HRE1	HYPOXIA RESPONSIVE ERF1	AT1G72360
HRE2	HYPOXIA RESPONSIVE ERF2	AT2G47520
HSFA4A	HEAT SHOCK TRANSCRIPTION FACTOR A4A	AT4G18880
ICK1	KIP-RELATED PROTEIN 1	AT2G23430
IMD1	ISOPROPYLMALATE DEHYDROGENASE 1	AT5G14200
LBD41	LATERAL ORGAN BOUNDARIES DOMAIN-CONTAINING PROTEIN 41	AT3G02550
LOX2	LIPOXYGENASE 2	AT3G45140
MIOX2	MYO-INOSITOL OXYGENASE 2	AT2G19800
NCED3	NINE-CIS-EPOXYCAROTENOID DIOXYGENASE 3	AT3G14440
PP2AA3	PROTEIN PHOSPHATASE 2A SUBUNIT A3	AT1G13320
PPDK	PYRUVATE ORTHOPHOSPHATE DIKINASE	AT4G15530
RPL13e	Ribosomal protein L13e family protein	AT5G23900
SEN1	SENESCENCE 1	AT4G35770
TAA1	TRYPTOPHAN AMINOTRANSFERASE OF ARABIDOPSIS 1	AT1G70560
THA1	THREONINE ALDOLASE 1	AT1G08630
TIP41	TAP42 INTERACTING PROTEIN OF 41 KDA	AT4G34270
UPF0041	uncharacterized protein family	AT4G22310
WOX4	WUSCHEL RELATED HOMEOBOX 4	AT1G46480
YUC8	YUCCA 8	AT4G28720

Liste der Arabidopsis-Gene, die mindestens dreimal im Fließtext vorkommen oder experimentell behandelt wurden. AGI: *Arabidopsis Genome Initiative* Gencode.

Zusammenfassung

Die Zunahme von extremen Wetterereignissen wie Dürre und Überflutung aufgrund des globalen Klimawandels stellt eine Bedrohung für viele Kulturpflanzen dar. Überflutung beeinträchtigt die aerobe Atmung und die Photosynthese, was eine Energiekrise zur Folge hat. Pflanzen aus überflutungsgefährdeten Gebieten haben spezifische metabolische und morphologische Anpassungen entwickelt, um die größten Herausforderungen in einer Umgebung mit überschüssigem Wasser zu bewältigen. Überflutungstolerante Arten überleben entweder durch Wachstumsförderung (*Escape*-Strategie) oder durch Wachstumsunterdrückung (*Quiescence*-Strategie). Beide Strategien wurden bereits ausführlich in der monokotylen Modellpflanze Reis (*Oryza sativa*) untersucht. Das molekulare Verständnis der Überlebensstrategien von dikotylen Pflanzen ist noch nicht ausreichend verstanden, da bisher keine überflutungstolerante Modellpflanze existiert, die genetisch zugänglich ist. Die Etablierung eines Modellorganismus und die Aufklärung von Überflutungstoleranzmechanismen können erheblich zur Entwicklung stressresistenter Nutzpflanzen beitragen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Verhalten von ausgewählten Wildpflanzen der Brassicaceae-Familie auf molekularer und physiologischer Ebene charakterisiert. Es konnte gezeigt werden, dass alle Rosettenpflanzen eine *Quiescence*-Strategie annahmen, aber das Überleben nach Überflutung stark variierte. Die Pflanzen wurden anhand ihrer Überflutungstoleranz wie folgt eingeordnet: *Arabidopsis thaliana* < *Cardamine hirsuta* < *Cardamine pratensis* < *Rorippa palustris* und *Rorippa sylvestris*. Die einzige nicht rosettenartig wachsende Art (*Nasturtium officinale*) zeigte bei Überflutung gegensätzliche, gewebespezifische Wachstumsreaktionen: Wachstumsförderung in den Stängeln und Wachstumsunterdrückung in den Petiolen. Die vorliegende Arbeit behandelt die Fragen, wie die gegensätzlichen Wachstumsreaktionen reguliert werden und welche Prozesse die Unterschiede in der Überflutungstoleranz beeinflussen.

Die bereits bekannten molekularen Mechanismen, die die Unterwasser-Elongation steuern, basieren weitgehend auf Studien zur Elongation der Internodien in Reis und zur Elongation der Petiolen in *Rumex*-Rosettenpflanzen. In dieser Arbeit wurde *N. officinale* als dikotyle Modellpflanze zur Analyse kontrastierender Wachstumsstrategien innerhalb einer einzelnen Pflanzenart vorgestellt. Eine genomweite Transkriptomanalyse ergab, dass Überflutung eine wesentliche Veränderung des Petiolen- und des Stängeltranskriptoms verursachte, während nur geringe qualitative Unterschiede zwischen beiden Geweben beobachtet wurden. Zu den Kernreaktionen bei Überflutung gehörten Hormon-regulierte Prozesse und die Anpassung des Stoffwechsels zur Energieeinsparung, während gewebespezifische Reaktionen mit der Abwehr, der Photosynthese und den Zellwandpolysacchariden in Verbindung gebracht wurden. Die molekulare und physiologische Charakterisierung deutet darauf hin, dass die Prozesse, die das Unterwasserwachstum in *N. officinale* regulieren, vom etablierten Wachstumsmodul,

das die Regulatoren Ethylen, Abscisinsäure (ABA) und Gibberellinsäure (GA) beinhaltet, abweichen. Das Unterwasserwachstum des Stängels wurde durch eine frühe Abnahme des ABA-Spiegels verursacht und nicht primär durch Ethylen, GA oder Brassinosteroide (BRs) vermittelt. Es bleibt allerdings unklar, welches Signal die anfängliche Abnahme des ABA-Gehalts einleitet, die für die Elongation des Stängels erforderlich ist. Ebenfalls konnte der Einfluss von Auxin auf die Unterwasserelongation des Stängels nicht vollständig geklärt werden. Eine in der Nacht beobachtete verstärkte Stängelelongation war nicht mit Sauerstoffmangel (Hypoxie) verbunden und deutet auf eine Regulation durch circadiane Rhythmik hin. Die Unterdrückung des Wachstums in der Petiole wird wahrscheinlich eher einem Stillstand des Zellzyklus als einer hormonellen Regulation zugeschrieben.

Um herauszufinden, worauf die Unterschiede in der Überflutungstoleranz beruhen, wurden die Rosettenpflanzen einem Multispezies-Vergleich mittels genomweiter Transkriptomanalyse unterzogen. In allen Arten wurden Kohlenhydrat-assoziierte Prozesse, Reaktionen auf Pathogene und Hormon-regulierte Signalwege induziert, während Biosynthese-Prozesse reprimiert wurden. Die physiologischen Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass Überflutung in allen Arten einen Kohlenhydratmangel auslöst. Die Überflutungstoleranz der toleranten Arten C. pratensis, R. palustris und R. sylvestris könnte dabei aber auf einen weniger stark ausgeprägten Kohlenhydratmangel zurückzuführen sein. Diese Annahme beruht auf der geringeren Induktion von Genen, die mit Kohlenhydratmangel assoziiert sind, einer höheren relativen Zuckerverfügbarkeit sowie der Induktion von Gärungsprozessen im Vergleich zu den sensitiven Arten A. thaliana und C. hirsuta. Die molekulare Analyse der Überflutungsreaktionen identifizierte BETA CARBONIC ANHYDRASE 3 (BCA3), das in A. thaliana für eine cytosolische Carboanhydrase codiert, als ein potenzielles Kandidatengen für Überflutungstoleranz. Dieses Gen wurde bei Überflutung ausschließlich in den toleranten Arten stark induziert (insbesondere in R. sylvestris). Allerdings führte weder die Überexpression von AtBCA3 noch von RsBCA3 in der sensitiven Art A. thaliana zu einer erhöhten Überflutungstoleranz im Vergleich zum Wildtyp. Obwohl die Kallus- und Sprossinduktion erfolgreich verlief, konnte im Rahmen dieser Arbeit kein Transformationsprotokoll für R. sylvestris etabliert werden. Folglich konnte die Inaktivierung von BCA3 mittels RNA-Interferenz (RNAi) nicht getestet werden. Der positive Einfluss von BCA3 auf die Überflutungstoleranz konnte somit weder bestätigt noch ausgeschlossen werden.

Diese Arbeit hebt die Vielfalt der Mechanismen in scheinbar ähnlichen Verhaltensweisen hervor, was die Bedeutung der Untersuchung von Überflutungsanpassungsmerkmalen bei einer Vielzahl von Arten bekräftigt. Es wurden neuartige dikotyle Pflanzensysteme vorgestellt, die als Grundlage für zukünftige Studien dienen können, um noch weitere unbekannte überflutungstolerante Gene und Prozesse identifizieren zu können.

Summary

The increase in extreme weather events such as droughts and floods due to global climate change is a threat to many crops. Flooding affects aerobic respiration and photosynthesis, resulting in an energy crisis. Plants that inhabit flood-risk areas have evolved specific metabolic and morphological traits to overcome the major challenges in an excess water environment. Flood-tolerant species survive either by growth promotion (escape strategy) or growth suppression (quiescence strategy). Both strategies have been extensively studied in the monocot model plant rice (*Oryza sativa*). The molecular understanding of survival strategies of dicotyledonous plants has not yet been sufficiently understood, since there is no flood-tolerant model plant that is genetically accessible. The establishment of a model organism and the elucidation of submergence tolerance mechanisms can contribute significantly to the development of stress-resistant crops.

In this work the behavior of selected wild species of the Brassicaceae family was characterized on a molecular and physiological level. It could be shown that all rosette plants adopted a quiescence strategy, but their survival after submergence varied significantly. The plants were ordered according to their submergence tolerance as follows: *Arabidopsis thaliana < Cardamine hirsuta < Cardamine pratensis < Rorippa palustris* and *Rorippa sylvestris*. The only non-rosette-growing species (*Nasturtium officinale*) showed antithetical, tissue-specific growth responses when submerged: growth promotion in the stems and growth suppression in the petioles. The present work deals with the questions of how the contrasting growth responses are regulated and which processes influence the differences in submergence tolerance.

Known molecular mechanisms controlling underwater elongation are based extensively on studies on internode elongation in the monocot rice and petiole elongation in *Rumex* rosette species. Here, *N. officinale* was presented as a dicot model plant to study contrasting growth strategies within one single plant species. A genome-wide transcriptome analysis revealed that submergence caused a substantial reconfiguration of the petiole and stem transcriptome, while only little qualitative differences were observed between both tissues. A core submergence response included hormonal regulation and metabolic readjustment for energy conservation, while tissue-specific responses were associated with defense, photosynthesis, and cell wall polysaccharides. Transcriptomic and physiological characterization suggested that the molecular processes regulating underwater growth in *N. officinale* deviate from the established ethylene, abscisic acid (ABA) and gibberellic acid (GA) growth regulatory module. The underwater stem elongation is driven by an early decline in ABA and is not primarily mediated by ethylene, GA or brassinosteroids (BRs). However, it remains elusive what signal causes the initial ABA depletion required for stem elongation. The influence of auxin on the underwater stem elongation has also not yet been fully clarified. An enhanced stem elongation

IX

observed in the night period was not linked to oxygen deficiency (hypoxia) and suggests an involvement of circadian regulation. The petiole growth suppression is likely attributed to a cell cycle arrest rather than hormonal regulation.

To identify the underlying mechanisms that cause the differences in submergence tolerance, the rosette plants were subjected to a multi-species comparison using a genome-wide transcriptome analysis. In all species, carbohydrate-associated processes, pathogen responses and hormoneregulated signaling pathways were induced, while biosynthesis processes were repressed. The physiological results of the present work demonstrate that submergence triggers carbohydrate starvation in all species. The submergence tolerance of the tolerant species C. pratensis, R. palustris und R. sylvestris could, however, be due to a less pronounced carbohydrate deficiency. This assumption is based on the lower induction of genes associated with carbohydrate starvation, a higher relative sugar availability and the induction of fermentation processes compared to the sensitive species A. thaliana and C. hirsuta. Molecular analysis of the submergence responses identified BETA CARBONIC ANHYDRASE 3 (BCA3), which encodes a cytosolic carbonic anhydrase in A. thaliana, as a potential candidate gene for submergence tolerance. This gene was strongly induced during submergence only in the tolerant species (especially in *R. sylvestris*). However, neither the overexpression of AtBCA3 nor of RsBCA3 in the sensitive species A. thaliana led to an increased submergence tolerance compared to the wild type. Although callus and shoot induction were successful, no transformation protocol for *R. sylvestris* could be established in this work. Consequently, the inactivation of BCA3 by RNA interference (RNAi) could not be tested. Thus, the positive influence of BCA3 on the submergence tolerance could neither be confirmed nor ruled out.

This study highlights the diversity in mechanisms in seemingly similar behaviors, which emphasizes the importance of studying flood-adaptive traits in a wide range of species. Novel dicot plant systems were presented that can serve as a basis for future studies to identify as yet unknown flood-adaptive genes and processes.

1. Einleitung

1.1 Überflutung ist ein komplexer Stress für Landpflanzen

Etwa 72 % der gesamten Erdoberfläche ist von Wasser bedeckt (Ponnamperuma, 1972). Wasser ist für das Wachstum und Überleben von Pflanzen essenziell, weshalb starke Schwankungen in der Wasserverfügbarkeit schädlich sein können. Pflanzen sind während ihres gesamten Lebenszyklus wechselnden Umweltbedingungen ausgesetzt und können aufgrund ihrer sessilen Lebensweise ungünstigen Umweltbedingungen nicht ausweichen. Infolge des Klimawandels haben Häufigkeit und Schweregrad extremer Wetterereignisse wie Überschwemmungen und Dürren in den letzten Jahrzehnten weltweit zugenommen und werden in Zukunft sehr wahrscheinlich weiter ansteigen (Hirabayashi et al., 2008, 2013; Kunkel et al., 2013; Alfieri et al., 2018; Myhre et al., 2019). Während Wassermangel zu Trockenstress führt, verursacht zu viel Wasser Überflutungsstress, welcher dabei in zwei Kategorien eingeteilt werden kann: bei Staunässe im Boden sind nur die Wurzeln zu viel Wasser ausgesetzt, sobald der Spross teilweise oder vollständig unter Wasser ist, spricht man von Überflutung (Sasidharan et al., 2017). Beide Formen des Überflutungsstresses stellen eine große Umweltgefahr für viele Kulturpflanzen dar (Bailey-Serres & Voesenek, 2008; Bailey-Serres et al., 2012b) und weltweit sind etwa 10 - 20 % der Anbauflächen von Staunässe bedroht (Setter & Waters, 2003). Überflutung ist ein komplexer Stress, bei dem die Pflanze mehreren Belastungen ausgesetzt ist: u.a. Energiekrise, Kohlenhydratmangel, reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und Toxizität (Colmer & Voesenek, 2009).

Pflanzen sind aerobe Organismen ohne ein Sauerstoff (O₂)-Transportsystem, weshalb sie auf die Zufuhr von O₂ aus der Umgebung durch Diffusion angewiesen sind (Armstrong, 1979). Unter normalen Bedingungen (Normoxie), d.h. in Luft und auf Meereshöhe, liegt die O₂-Verfügbarkeit bei 20,95 % (Sasidharan *et al.*, 2017). In gut durchlüfteten Böden sind die Bodenporen mit Bodenluft gefüllt, die in ihrer Zusammensetzung der atmosphärischen Luft sehr ähnlich ist (Russell & Appleyard, 1915). Bei Überflutung sinkt jedoch die O₂-Verfügbarkeit durch die Verdrängung der Bodenluft durch Wasser und die Diffusionsgeschwindigkeit von Gasen in Wasser ist um den Faktor 10⁴ herabgesetzt im Vergleich zu Luft (Armstrong, 1979; Jackson, 1985). Eine Abweichung von der normoxischen O₂-Konzentration wird bei einem O₂-Mangel als Hypoxie, dem vollständigen Fehlen von freiem O₂ als Anoxie und bei einem O₂-Überangebot als Hyperoxie bezeichnet (van Dongen & Licausi, 2015). Dabei ist jedoch zu beachten, dass sich die O₂-Konzentration der Umgebung stark von der O₂-Konzentration im pflanzlichen Gewebe unterscheiden kann. In *Arabidopsis thaliana* Wurzel- und Sprossgeweben sank der O₂-Partialdruck innerhalb weniger Stunden nach Überflutung drastisch, während der O₂-Partialdruck im Boden zwar kontinuierlich, aber langsamer abnahm (Lee *et al.*, 2011). Unter normoxischen Bedingungen nutzt die Pflanze einen aeroben Stoffwechsel, bei dem NAD⁺-Regeneration primär durch mitochondrielle Atmung stattfindet und Energie in Form von ATP durch oxidative Phosphorylierung gebildet wird (Bailey-Serres & Voesenek, 2008). Fehlt O₂ als terminaler Elektronenakzeptor in der Atmungskette, tritt eine Hemmung der Cytochrom c Oxidase-Aktivität auf, wodurch keine Reduktion von O₂ zu Wasser stattfinden kann (Chandel *et al.*, 1996; Geigenberger, 2003). Infolgedessen ist die oxidative Phosphorylierung eingeschränkt, was letztendlich zu einem reduzierten zellulären ATP-Gehalt führt. Durch den Wechsel zu einem anaeroben Metabolismus kann ATP über die Glykolyse gebildet und NAD⁺ über Fermentation regeneriert werden (Bailey-Serres & Voesenek, 2008). Die Mobilisierung von löslichen Zuckern und Stärke kann so als Energiequelle dienen (Fukao & Bailey-Serres, 2004).

Bei Überflutung wird die Pflanze außerdem mit einer beeinträchtigten Lichtintensität und Lichtqualität konfrontiert, welche durch trübes Wasser hervorgerufen wird und abhängig von der Wassertiefe ist (Vervuren *et al.*, 2003). Während Wurzeln auch unter normalen Bedingungen häufig hypoxisch sind, leidet der Spross bei vollständiger Überflutung nur nachts bzw. in Dunkelheit unter O₂-Mangel (Mommer *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2011; Vashisht *et al.*, 2011; van Veen *et al.*, 2013). Tagsüber kann die Photosynthese einen Teil des für die Atmung erforderlichen O₂ liefern. Aufgrund der verringerten Lichtintensität und des langsamen Eintritts von Kohlenstoffdioxid (CO₂) in die Blätter ist die Photosynthese unter Wasser jedoch stark eingeschränkt, wodurch die Zucker- und Stärkereserven der Pflanze nicht ausreichend aufgefüllt werden (Mommer & Visser, 2005; Pedersen *et al.*, 2013). Der gleichzeitige Verbrauch von gespeicherten Zuckern und Stärke durch Atmung oder Fermentation ruft einen Hungerzustand, ähnlich wie bei anhaltender Dunkelheit, hervor und führt zu Zellschäden oder Zelltod (Bailey-Serres & Voesenek, 2008; Colmer & Voesenek, 2009; Fukao *et al.*, 2019).

Molekularer O₂ dient nicht nur der Atmung in den Mitochondrien, sondern auch der Biosynthese von Fettsäuren und der Bildung von ROS (Geigenberger, 2003; Fukao & Bailey-Serres, 2004). ROS, z. B. Hyperoxid-Anion (O₂.⁻), Hydroxyl-Radikal (HO·), Wasserstoffperoxid (H₂O₂) und Singulett-Sauerstoff (¹O₂) werden bei Hypoxie und insbesondere bei Wiederbelüftung gebildet (Blokhina *et al.*, 2001, 2003). Die Bildung kann dabei enzymatisch, beispielsweise durch Peroxidasen und NADPH-Oxidasen oder nicht-enzymatisch als Nebenprodukt in den Chloroplasten oder Mitochondrien erfolgen (Apel & Hirt, 2004). Überflutung im Licht kann durch CO₂-Mangel die Photorespiration erhöhen, was zu einer erhöhten ROS-Produktion in den Peroxisomen führen kann (Mommer & Visser, 2005; del Río & López-Huertas, 2016). Der negative Einfluss von ROS beruht auf dem Verursachen von Zellschäden, insbesondere durch Schädigung von Lipiden, Proteinen, Kohlenhydraten und Nukleinsäuren (Blokhina *et al.*, 2003). Bei Überflutung oder Staunässe verbrauchen aerobe Mikroorganismen den verfügbaren O₂ im Boden, wodurch dieser innerhalb von 24 h anoxisch wird (Vashisht *et al.*, 2011). Anstelle von O₂ werden dann Nitrat (NO₃⁻), Mangan (Mn⁴⁺), Eisen (Fe³⁺) und Sulfat (SO₄²⁻) von anaeroben Mikroorganismen als alternative Elektronenakzeptoren verwendet, wodurch NH₄⁺, Mn²⁺, Fe²⁺ und Schwefelwasserstoff (H₂S) entstehen (Ponnamperuma, 1972; Armstrong, 1979; Shabala, 2011). Als Folge der anaeroben Atmung durch Bodenbakterien befindet sich der Boden somit bei Überflutung in einem reduzierten Zustand (Ponnamperuma, 1972). Neben anorganischen Substanzen (z. B. Mn²⁺, Fe²⁺, H₂S) reichern sich im Boden auch organische Substanzen wie Ethanol, Acetaldehyd, kurzkettige Fettsäuren und phenolische Verbindungen an, die von der Pflanze aufgenommen werden und potenziell toxisch wirken können (Tanaka *et al.*, 1968; Ponnamperuma, 1972; Armstrong & Armstrong, 2005; Shabala, 2011).

1.2 Veränderte Genexpression bei Hypoxie und Sauerstoffwahrnehmung

Hypoxie tritt nicht nur bei Überflutung auf, sondern auch, wenn die Atmungsaktivität die O₂-Verfügbarkeit übersteigt. Die O₂-Verfügbarkeit kann daher in metabolisch aktiven oder sehr dichten Geweben reduziert sein, z. B. in wachsenden Kartoffelknollen (Geigenberger et al., 2000; Licausi et al., 2011a), Früchten (Biais et al., 2010; Ho et al., 2011), Wurzeln (Lee et al., 2011; Shukla et al., 2019) und Meristemen (Greve T. et al., 2003; Weits et al., 2019). Es konnte außerdem beobachtet werden, dass die Geschwindigkeit des O₂-Verbrauchs von der O₂-Verfügbarkeit in der Umgebung abhängt, um so anoxischen Bedingungen im pflanzlichen Gewebe vorzubeugen und Energie zu sparen (Zabalza et al., 2009). Bei Überflutung, Hypoxie und Wiederbelüftung findet eine Veränderung in der Genexpression statt, die auf epigenetischer, transkriptioneller und translationaler Ebene reguliert wird (Branco-Price et al., 2005, 2008; Tsuji et al., 2006; Mustroph et al., 2009; Juntawong et al., 2014; Loreti et al., 2016; Lee & Bailey-Serres, 2019). Insbesondere wurden in der überflutungssensitiven Art A. thaliana 49 Hypoxie-responsive Gene (HRGs) identifiziert, die unter O2-Mangel in allen Geweben eine Anreicherung der messenger-RNA (mRNA) zeigen. Diese HRGs codieren u. a. für Transkriptionsfaktoren, Signalproteine und anaerobe Stoffwechselenzyme (Mustroph et al., 2009). Die mRNAs der HRGs akkumulieren bei Hypoxie im Cytosol und werden sofort aktiv translatiert, wohingegen viele andere Gene bei Hypoxie entweder gar nicht transkribiert werden oder durch die Anreicherung der mRNA im Zellkern nicht translatiert werden (Lee & Bailey-Serres, 2019). Etwa 50 % der Promotoren der HRGs enthalten ein Hypoxie-responsives Promotorelement (HRPE), welches von spezifischen Gruppe VII Ethylene Response Factor (GVII ERF) Transkriptionsfaktoren erkannt wird (Gasch et al., 2016). Durch Bindung der Transkriptionsfaktoren an das HRPE wird die Transkription von HRGs und die damit verbundene Stressantwort, z. B. Wechsel von aeroben zu anaeroben Stoffwechsel, hervorgerufen (Gasch et al., 2016). Interessanterweise wird die Transkription von HRGs erst induziert, wenn die Abnahme der O₂-Konzentration mit einem Energieverlust durch die Abnahme des zellulären ATP-Spiegels einhergeht (Schmidt *et al.*, 2018).

Durch den Wechsel von aerober Atmung zu Lactat- und Ethanol-Gärung wird die Produktion von ATP und Regeneration von NAD⁺ aufrechterhalten (Bailey-Serres & Voesenek, 2008). Als Folge der Lactat-Gärung findet jedoch eine Ansäuerung des Cytoplasmas (cytoplasmatische Acidose) statt, was zum Zelltod im pflanzlichen Gewebe führen kann (Roberts *et al.*, 1984a,b). Das Enzym der Lactat-Gärung, die Lactatdehydrogenase (LDH), wird allerdings durch einen niedrigen pH-Wert inhibiert, wodurch ein Wechsel zur alkoholischen Gärung stattfindet und Ethanol durch die Enzyme Pyruvatdecarboxylase (PDC) und Alkoholdehydrogenase (ADH) gebildet wird (Roberts *et al.*, 1984b; Bailey-Serres *et al.*, 2012a). Da Ethanol aus den Zellen in das externe Milieu diffundiert, führt dies zu einem Verlust von Kohlenstoff (Bailey-Serres *et al.*, 2012a). Um diesem entgegenzuwirken, bilden einige Spezies bei Hypoxie die Aminosäure Alanin aus Pyruvat mittels Alanin-Aminotransferase (AlaAT) und recyceln Alanin wieder zu Pyruvat bei Wiederbelüftung, wobei jedoch keine Regeneration von NAD⁺ stattfindet (Miyashita *et al.*, 2007; Bailey-Serres & Voesenek, 2008; Bailey-Serres *et al.*, 2012a). Obwohl die ATP-Produktion bei Hypoxie geringer ist – 2-4 Mol ATP pro Mol Hexose verglichen zu 30-36 Mol ATP durch aerobe Atmung – wird so dennoch ein Überleben der Zellen bei ausreichender Zuckerverfügbarkeit gewährleistet (Bailey-Serres & Voesenek, 2008; Bailey-Serres *et al.*, 2012a).

Der zugrunde liegende Mechanismus der O₂-Wahrnehmung in Pflanzen wurde 2011 durch zwei Forschungsgruppen in A. thaliana beschrieben: der Arginin/N-Degron Pathway (früher N-end rule pathway) der zielgerichteten Proteolyse fungiert als Stickstoffmonoxid und Sauerstoff (NO/O₂)-Sensor durch die homöostatische Regulation der Stabilität der GVII ERFs (Gibbs et al., 2011; Licausi et al., 2011b; Varshavsky, 2019). Der N-Degron Pathway ist ein evolutionär konservierter Mechanismus, bei dem bestimmte zelluläre Proteine basierend auf der Erkennung destabilisierender Aminosäurereste am N-Terminus durch das Ubiquitin-Proteasom System abgebaut werden (Varshavsky, 2011, 2019; Dissmeyer, 2019). Das A. thaliana-Genom codiert für fünf GVII ERFs: RELATED TO APETALA2 2 (RAP2.2), RAP2.12 und RAP2.3 sowie HYPOXIA RESPONSIVE ERF1 (HRE1) und HRE2, deren konserviertes MCGGAAI/L-Motiv am N-Terminus als Substrat für den Arginin/N-Degron Pathway dient (Nakano et al., 2006; Licausi et al., 2010; Gibbs et al., 2011). Dabei wird zunächst die N-terminale Aminosäure Methionin (Met₁) durch Methionin-Aminopeptidasen (MAP1/2) abgespalten. Die dadurch exponierte Aminosäure Cystein (Cys₂) kann nun O₂- und vermutlich auch NO-abhängig durch Plant Cystein Oxidasen (PCO1/2) oxidiert werden (Gibbs et al., 2014; Weits et al., 2014; White et al., 2017, 2018). Das oxidierte Cys₂ dient als Substrat für Arginin-tRNA-Transferasen (ATE1/2), wodurch ein Arginin (Arg) durch eine Peptidbindung angefügt wird (White et al., 2017). Der N-Terminus NH₂-Arg₁-Cys₂ wird von der E3-Ubiquitinligase PROTEOLYSIS 6 (PRT6) erkannt, was eine Poly-Ubiquitinierung des Proteins und den Abbau durch das 26S-Proteasom zur Folge hat. Durch einen Mangel an O₂- bzw. NO-vermittelter Cys₂-Oxidation wird der Abbau der GVII ERFs inhibiert. Steigt die O₂-Verfügbarkeit, werden die GVII ERFs erneut destabilisiert, wodurch die Transkription der HRGs abgeschaltet wird und die Pflanze wieder auf einen aeroben Stoffwechsel zurückgreifen kann. Darüber hinaus fungieren spezifische Histon-modifizierende Enzyme ebenfalls als O₂-Sensoren, weshalb ein Zusammenhang zwischen O₂-Wahrnehmung und epigenetischer Regulation der Pflanzenentwicklung vermutet wird (Gibbs *et al.*, 2018; Batie *et al.*, 2019; Chakraborty *et al.*, 2019).

1.3 Aquatische Organismen nutzen Hydrogencarbonat zur Unterwasser-Photosynthese

Pflanzen sind autotrophe Organismen, die mittels Photosynthese aus CO₂, Wasser und Lichtenergie den Zucker Glucose und O₂ bilden. Die Photosyntheserate kann dabei entweder als O₂-Produktion oder CO₂-Assimilation bestimmt werden (Pedersen *et al.*, 2013). An der Luft liegt CO₂ als Gas vor, welches gut in Wasser löslich ist. Deshalb liegen im Wasser, u. a. abhängig vom pH-Wert, neben CO₂ auch Hydrogencarbonat (HCO₃⁻¹) und Carbonat-Ionen (CO₃²⁻) vor. Die reversible Hydratisierung von CO₂ zu HCO₃⁻⁻ wird durch Carboanhydrasen (CAs) katalysiert (Khalifah, 1971). CAs sind Zink-Metalloenzyme, die zunächst in roten Blutkörperchen entdeckt wurden und deren Existenz auch in Pflanzen und Bakterien bestätigt wurde (Hewett-Emmett & Tashian, 1996). Pflanzliche CAs können in drei Familien unterteilt werden: α-, β- und γ-CAs, welche sich wahrscheinlich unabhängig voneinander entwickelt haben (Hewett-Emmett & Tashian, 1996; Moroney *et al.*, 2001).

Im Meer und Süßwasser ist die Konzentration von HCO_3^- im Vergleich zur CO_2 -Konzentration um ein Vielfaches erhöht (Smith & Walker, 1980; Pedersen *et al.*, 2013). Deshalb haben sich viele aquatische Organismen HCO_3^- als alternative Kohlenstoffquelle nutzbar gemacht, darunter aquatische Pflanzen, Algen und Cyanobakterien (Sand-Jensen & Gordon, 1984; Maberly, 1990; Sand-Jensen *et al.*, 1992; Price *et al.*, 2004). Die Nutzung von HCO_3^- als Alternative zu CO_2 ist bisher nur bei wenigen amphibischen Pflanzen und nicht bei Landpflanzen bekannt (Sand-Jensen *et al.*, 1992; Nielsen & Sand-Jensen, 1993; Horiguchi *et al.*, 2019). Als Anion kann HCO_3^- die Lipiddoppelschicht biologischer Membranen nicht passieren, weshalb HCO_3^- entweder über Membrantransportproteine oder über Diffusion in Form von CO_2 in die Zellen gelangt (Poschenrieder *et al.*, 2018). In Seegräsern werden drei Mechanismen zur Aufnahme von HCO_3^- beschrieben (Beer & Rehnberg, 1997; Beer *et al.*, 2002; Uku *et al.*, 2005). Erstens wurde die Dehydratisierung von HCO_3^- zu CO_2 durch apoplastische CAs und anschließende Diffusion von CO_2 über die Plasmamembran beschrieben (1). Zweitens wird die H⁺-ATPase-vermittelte Ansäuerung des Apoplasten und der Diffusionsgrenzschicht beobachtet, welche das Gleichgewicht von HCO_3^- und CO_2 in Richtung CO_2 schiebt (2). Drittens wird die direkte, Symporter-vermittelte Aufnahme

von HCO_3^- und H^+ und die anschließende Dehydratisierung von HCO_3^- zu CO_2 durch cytosolische CAs vermutet (3). Dabei kann die Katalyse von HCO_3^- zu CO_2 durch apoplastische CAs mittels Acetazolamid (Mechanismus 1 und 2), die Katalyse durch intrazelluläre CAs mittels Ethoxyzolamid (Mechanismus 2) und der Plasmamembransymport von HCO_3^-/H^+ durch Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS) (Mechanismus 2 und 3) gehemmt werden (Beer *et al.*, 2002; Poschenrieder *et al.*, 2018; Horiguchi *et al.*, 2019).

Cyanobakterien besitzen drei HCO₃⁻-Transporter: den ATP binding casette (ABC) Transporter BCT1 (BICARBONATE TRANSPORTER 1) sowie die Na⁺-abhängigen Transporter SbtA (SODIUM BICARBONATE TRANSPORTER A) und BicA (BICARBONATE TRANSPORTER A), welche unterschiedliche Affinitäten für HCO₃⁻ besitzen (Omata et al., 1999; Price et al., 2004, 2011). Weitere bekannte HCO₃⁻-Transporter sind LCIA (LOW CO₂ INDUCIBLE A) in der Chloroplastenmembran und HLA3 (auch MULTIDRUG-RESISTANCE-RELATED PROTEIN 1, CrMRP1) in der Plasmamembran von Chlamydomonas reinhardtii (Duanmu et al., 2009; Wang & Spalding, 2014; Yamano et al., 2015) sowie SLC4 (SOLUTE CARRIER 4) in der Plasmamembran von Kieselalgen (Nakajima et al., 2013). Bisher konnte noch kein selektiver HCO₃-Transporter in Pflanzen isoliert werden. Es konnte auch noch nicht gezeigt werden, dass amphibische Pflanzen bei Überflutung ein HCO₃-Transportsystem induzieren können (Poschenrieder *et al.*, 2018; Horiguchi et al., 2019). Dennoch kann die Möglichkeit eines spezifischen oder unspezifischen Membrantransports nicht ausgeschlossen werden. Überflutete Blätter der amphibischen Art Hygrophila difformis zeigten eine Sensitivität gegenüber Ethoxyzolamid, aber nicht gegenüber Acetazolamid und TRIS, was auf einen H⁺-unabhängigen HCO₃⁻-Membrantransport hindeutet (Horiguchi *et al.,* 2019). Der Bor-Transporter BOR1 aus A. thaliana ist ein Mitglied der SLC4 Transporterfamilie (Takano et al., 2002; Thurtle-Schmidt & Stroud, 2016). Die Fähigkeit von BOR1 zum Transport von HCO₃- wird zwar vermutet, ist aber nicht vollständig geklärt (Frommer & von Wirén, 2002; Roberts, 2006). In A. thaliana-Hypokotylen konnte der bisher einzige Nachweis eines HCO₃-permeablen Anionenkanals gebracht werden (Frachisse et al., 1999).

1.4 Anpassungen und Überlebensstrategien von Landpflanzen bei Überflutung

1.4.1 Strategien zur Verbesserung des Unterwasser-Gasaustauschs

Die Überlebensrate von Landpflanzen ist bei Überflutung im Licht höher als bei Überflutung in Dunkelheit, was auf eine fortlaufende Photosynthese unter Wasser zurückzuführen ist (Blom *et al.*, 1994; Mommer & Visser, 2005; Vashisht *et al.*, 2011). Obwohl die Unterwasser-Photosynthese bei Landpflanzen geringer ist als bei aquatischen Pflanzen (Sand-Jensen *et al.*, 1992; Colmer *et al.*, 2011), trägt sie dennoch erheblich zum Überleben der Landpflanzen bei, indem sie O_2 zur inneren Belüftung und

Zucker für den Energiestoffwechsel liefert (Mommer & Visser, 2005; Winkel et al., 2013). Bei Überflutung wird der Gasaustausch, z. B. der Eintritt von CO₂ für die Photosynthese, zwischen Pflanze und Umwelt aufgrund der langsamen Diffusionsgeschwindigkeit erheblich eingeschränkt (Jackson, 1985). Viele Pflanzenarten, die an Fluss- und Seeufern leben, besitzen einen semi-aquatischen Lebensstil und Anpassungen zur Verbesserung des Unterwasser-Gasaustauschs (Sand-Jensen & Frost-Christensen, 1999). Einige (semi-)aquatische bzw. amphibische Pflanzen, z. B. H. difformis (Horiguchi et al., 2019), Ludwigia arcuata (Kuwabara et al., 2003), Rorippa aquatica (Nakayama et al., 2014), Rumex palustris (Mommer et al., 2007), Ranunculus-Arten (Cook & Johnson, 1968; Nielsen & Sand-Jensen, 1993; Kim et al., 2018) und Potamogeton-Arten (Frost-Christensen & Sand-Jensen, 1995), können beispielsweise verschiedene Blattformen als Reaktion auf unterschiedliche Umweltbedingungen bilden. Emers (über Wasser) gebildete Blätter unterscheiden sich dabei stark von submers (unter Wasser) gebildeten Blättern, ein Phänomen, was als Heterophyllie bezeichnet wird (Wells & Pigliucci, 2000). Merkmale und Folgen dieser submers gebildeten Blätter sind u. a. eine größere spezifische Blattfläche, dünnere und/oder gefiederte Blätter, eine geringere Anzahl an Stomata, eine reduzierte Blattvenendichte, eine reduzierte oder nicht-vorhandene Cuticula und eine Umorientierung der Chloroplasten in die Epidermis für einen verbesserten CO₂-Eintritt (Wells & Pigliucci, 2000). Aquatische Blätter von Ru. palustris enthalten außerdem weniger Ribulose-1,5-bisphosphat-carboxylase/-oxygenase (RuBisCO)-Protein als terrestrische Blätter, aber besitzen dennoch eine erhöhte Unterwasser-Photosyntheserate (Mommer *et al.,* 2005).

In terrestrischen Blättern verläuft der Gasaustausch mit der umgebenden Luft durch offene Stomata. Unter Wasser stellt die Cuticula eine Diffusionsbarriere für Gase dar, da die Gase die Cuticula aufgrund fehlender (Olsen *et al.*, 2016; Kim *et al.*, 2018) oder nicht-funktionierender Stomata (Shtein *et al.*, 2017) überwinden müssen. Es konnte gezeigt werden, dass eine höhere O_2 -Permeabilität in submersen Blättern auf eine dünnere Cuticula und somit eine geringere Diffusionsbarriere zurückzuführen ist (Frost-Christensen *et al.*, 2003; Mommer *et al.*, 2004; Mommer & Visser, 2005). Damit einhergehend erhöht sich die Verfügbarkeit von CO_2 und O_2 für Photosynthese und aerober Atmung und führt so zu einem besseren Überleben bei Überflutung (Mommer *et al.*, 2004, 2006b). Die Entwicklung neuer, akklimatisierter Blätter benötigt allerdings mehrere Tage, währenddessen die Unterwasser-Photosyntheserate weiterhin verringert ist. Die Bildung der akklimatisierten Blätter zahlt sich folglich erst bei länger anhaltender Überflutung aus (Colmer *et al.*, 2011). Zudem konnte die Bildung akklimatisierter Blätter sowohl in toleranten als auch in sensitiven Arten beobachtet werden (Mommer *et al.*, 2007). Eine veränderte Blattanatomie ist somit kein Grund, sondern vielmehr eine Voraussetzung für eine erhöhte Überflutungstoleranz (Mommer *et al.*, 2007).

In manchen terrestrischen Feuchtgebietspflanzen kann ein kontinuierlicher und deutlich schnellerer Gasaustausch auch über die Stomata ihrer bereits vorhandenen terrestrischen Blätter durch Ausbildung eines Gasfilms auf der hydrophoben Blattoberfläche erfolgen (Raskin & Kende, 1983; Colmer & Pedersen, 2008a; Verboven et al., 2014). Dieser Gasfilm erscheint unter Wasser als silberne Außenschicht der Blätter und bildet eine Schnittstelle zwischen der Gas- und Wasserphase und umgeht so die Widerstandsfähigkeit der Cuticula (Colmer & Pedersen, 2008a). Die Gase (O₂ bei Dunkelheit, CO₂ im Licht) müssen nun zwar zunächst eine Diffusionsgrenzschicht überwinden, können sich dann aber innerhalb des Gasfilms schneller als noch im umgebenden Wasser bewegen und durch die Stomata in das Blatt eindringen (Raskin & Kende, 1983; Pedersen et al., 2009; Verboven et al., 2014). Gasfilme verbessern die Unterwasser-Photosynthese, die innere Belüftung, den Zuckerstatus und das Wachstum in Reis und leisten so einen wesentlichen Beitrag zur Überflutungstoleranz (Pedersen et al., 2009; Winkel et al., 2013, 2014; Mori et al., 2019). Der positive Einfluss des Gasfilms auf die Unterwasser-Photosynthese konnte auch in weiteren Landpflanzen aus Feuchtgebieten nachgewiesen werden (Colmer & Pedersen, 2008a; Colmer et al., 2011). Zudem wirkte sich bei Reis das künstliche Entfernen eines Gasfilms negativ auf die Bildung von Chlorophyll und Proteinen (Raskin & Kende, 1983) sowie auf die Unterwasser-Photosyntheserate aus, sodass ohne Gasfilm eine geringere Unterwasser-Photosyntheserate als mit Gasfilm erreicht wurde (Pedersen *et al.*, 2009).

1.4.2 Anpassungen zur Verbesserung der inneren Belüftung

Einige Pflanzenarten haben morphologische und anatomische Modifikationen entwickelt, um dem O₂-Mangel im Gewebe entgegenzuwirken und durch eine verbesserte innere Belüftung die überfluteten Organe mit O₂ zu versorgen (Voesenek *et al.*, 2006). Eine weit verbreitete Modifikation ist die Bildung von Aerenchymen, wobei es sich um ein interzellularenreiches Durchlüftungsgewebe handelt, das den Langstreckentransport von Gasen innerhalb der Pflanzenorgane ermöglicht (Armstrong, 1979; Colmer, 2003; Voesenek *et al.*, 2006). Es gibt zwei Grundformen von Aerenchymen, die entweder durch Zelltrennung an der Mittellamelle während der Entwicklung (schizogenes Aerenchym) oder durch programmierten Zelltod und Auflösen der Zellen (lysigenes Aerenchym) entstehen (Drew *et al.*, 2000). Durch die Ausbildung von Aerenchymen wird zum einen die Anzahl der O₂-verbrauchenden Zellen reduziert, wodurch mehr O₂ für die übrig gebliebenen Zellen zur Verfügung steht, zum anderen wird die Anzahl der interzellulären Lufträume und damit der O₂-Transport in den überfluteten Organen erhöht (Geigenberger, 2003). Aerenchyme können sowohl in der Wurzel als auch in Stängeln und Blättern gebildet werden (Armstrong, 1979).

Manche Pflanzenarten, z. B. Solanum dulcamara, Ru. palustris und Reis bilden bei Überflutung auch sogenannte Adventivwurzeln aus Sprossen, die das Primärwurzelsystem ersetzen und ebenfalls

Aerenchyme enthalten können (Bleecker *et al.*, 1986; Visser *et al.*, 2000; Sauter, 2013; Dawood *et al.*, 2014). Die Art des gebildeten Aerenchyms hängt dabei von der Pflanzenart, dem Gewebe und den Umweltbedingungen ab (Justin & Armstrong, 1987; Schussler & Longstreth, 1996; Colmer, 2003; Evans, 2003). Bei *Sagittaria lancifolia* wurde beispielsweise die Bildung von lysigenem Aerenchym in Wurzeln und die Bildung von schizogenem Aerenchym in Petiolen beobachtet (Schussler & Longstreth, 1996). Lysigenes Aerenchym wird außerdem in einigen Kulturpflanzen, z. B. Gerste, Mais und Weizen (Evans, 2003; Yamauchi *et al.*, 2014) sowie manchen *Ranunculus*-Arten (He *et al.*, 1999) verstärkt durch Überflutung bzw. Hypoxie gebildet, während es beispielsweise in Reis (Jackson *et al.*, 1985) oder anderen *Ranunculus*-Arten (He *et al.*, 1999) konstitutiv zu finden ist. Schizogenes Aerenchym kommt beispielsweise bei *Ru. palustris* vor (Visser *et al.*, 2000).

Manche Pflanzen aus Feuchtgebieten haben außerdem Barrieren durch Einlagerung von Lignin und Suberin in den äußeren Zellschichten der (Adventiv-) Wurzeln entwickelt, um zusätzlichem O₂-Verlust an die anoxische Umgebung entgegenzuwirken (Armstrong & Armstrong, 2005; Watanabe *et al.*, 2013; Shiono *et al.*, 2014). Sowohl monokotyle als auch dikotyle Pflanzen sind in der Lage, Barrieren gegen radialen O₂-Verlust (ROL, *radial oxygen loss*) zu bilden. Während die Bildung dieser ROL-Barrieren bei manchen Pflanzenarten (z. B. Reis, *Caltha palustris, Zea nicaraguensis*) durch Staunässe oder Anoxie induziert wird (Visser *et al.*, 2000; Abiko *et al.*, 2012), können andere Pflanzenarten (z. B. *Echinochloa*-Wildpflanzen) ROL-Barrieren konstitutiv bilden (Ejiri & Shiono, 2019). Diese Barrieren verhindern nicht nur den ROL, sondern fördern zudem eine longitudinale O₂-Diffusion in die Wurzelspitze und bieten einen Schutz vor der Aufnahme von toxischen Substanzen (Armstrong, 1979; Visser *et al.*, 2000; Colmer, 2003; Shabala, 2011). Das Vorhandensein von ROL-Barrieren wurde außerdem schon in Zusammenhang mit einer verbesserten Toleranz gegenüber Staunässe gebracht (Armstrong, 1979; Malik *et al.*, 2011; Watanabe *et al.*, 2013). Beispielsweise trägt die Bildung von Aerenchymen und ROL-Barrieren in *Zea nicaraguensis* zu einem verbesserten O₂-Transport und so zu einer erhöhten Toleranz gegenüber Staunässe im Vergleich zu *Zea mays* bei (Abiko *et al.*, 2012).

1.4.3 Gegensätzliche Wachstumsreaktionen: Vermeidungs- und Durchhaltestrategie

Überflutungstolerante Arten haben zwei Strategien entwickelt, um Überflutung zu überleben (Bailey-Serres & Voesenek, 2008): die *Escape*-Strategie durch Wachstumsförderung (*low oxygen escape syndrome*; Vermeidungsstrategie) und die *Quiescence*-Strategie durch Wachstumsunterdrückung (Durchhaltestrategie). Pflanzen mit einer *Escape*-Strategie, z. B. *Ru. palustris*, die Tiefwasserreissorte C9285 und *Ranunculus sceleratus*, verlängern schnell Stängel, Blätter oder Petiolen, um die Wasseroberfläche zu erreichen und so den Zugang zu sauerstoffreicher Luft zu ermöglichen (Rijnders *et al.*, 1996; He *et al.*, 1999; Hattori *et al.*, 2009; van Veen *et al.*, 2013). Dies ist oft mit einer hyponastischen Bewegung der Blätter verbunden (Cox *et al.*, 2003; Voesenek *et al.*, 2006). Das Wachstum bei einer Sturzflut kann sich allerdings auch negativ auswirken, da es die Energiespeicher schnell aufbraucht und die Pflanzen beim Rückgang des Wassers umknicken können, was bei Reis sowohl die Produktivität als auch die Kornqualität herabsetzt (Das *et al.*, 2005). Deshalb ist das Unterwasser-Wachstum nur dann von Vorteil, wenn die Überflutung länger andauert, die Überflutungstiefe die Elongationskapazität der Pflanze nicht überschreitet und durch das Erreichen der Wasseroberfläche die innere Belüftung verbessert wird (Voesenek *et al.*, 2004). Letzteres wird nur dann ermöglicht, wenn die Organe über der Wasseroberfläche aufgrund einer hohen Gewebeporosität als wirksamer Schnorchel fungieren können (Mommer *et al.*, 2006a, 2007; Pierik *et al.*, 2009; Akman *et al.*, 2012).

Das Unterwasser-Wachstum wurde bereits in verschiedenen Pflanzenarten mit einer erhöhten Zellteilung und/oder Zellstreckung in Verbindung gebracht (Métraux & Kende, 1984; Ridge & Amarasinghe, 1984; Voesenek et al., 1990). Die Zellteilung wird durch eine große Anzahl von Zellzyklusregulatoren gesteuert, meist Cyclin-abhängige Kinasen (CDKs) und erfordert die DNA-Replikationsmaschinerie (Vandepoele et al., 2002; Dewitte & Murray, 2003; Shultz et al., 2007). Während des Wachstums wird die Zellstreckung durch strukturelle Veränderungen der Zellwand, unter Beteiligung von zellwandmodifizierenden Proteinen, ermöglicht. Die pflanzliche Primärzellwand besteht aus Cellulose-Mikrofibrillen und den komplexen Polysacchariden Hemicellulose (meist Xyloglucan in dikotylen Pflanzen) und Pektin (Sasidharan et al., 2011). Auf diese Hauptkomponenten zielen große Genfamilien von zellwandmodifizierenden Proteinen ab: Expansine (EXPs) (Sampedro & Cosgrove, 2005), Xyloglucan-Endotransglucosylasen/Hydrolasen (XTHs) (Yokoyama & Nishitani, 2001) und Pektinmethylesterasen (PMEs) (Pelloux et al., 2007). EXPs lösen nichtkovalente Bindungen zwischen Cellulose und Hemicellulose auf (McQueen-Mason & Cosgrove, 1995), XTHs spalten und verbinden Xyloglucane neu (Fry et al., 1992) und PMEs katalysieren die Hydrolyse von Methylestergruppen von Pektin (Micheli, 2001). Ein Zusammenhang zwischen einer verstärkten Expression und Aktivität von EXPs, XTHs und/oder PMEs und der Elongation bei Überflutung konnte bereits in Reis, Ru. palustris, Sagittaria pygmaea und Regnellidium diphyllum festgestellt werden (Kim et al., 2000; Vriezen et al., 2000; Ookawara et al., 2005; Minami et al., 2018). Gleichzeitig erfordern höhere Zellteilungsraten und vermehrte Zellwandsynthese erhebliche Mengen an Energie und Kohlenhydraten (Voesenek et al., 2004). Eine anfänglich hohe Menge an Kohlenhydraten und die Fähigkeit, die CO₂-Assimilation während der Überflutung aufrechtzuerhalten, ist deshalb unerlässlich, um ausreichend Energie für ein schnelles Wachstum mit steigendem Wasser zur Verfügung zu haben (Das *et al.*, 2005).

Während die *Escape*-Strategie eine Vermeidungsstrategie darstellt, ist die *Quiescence*-Strategie dagegen eine Durchhaltestrategie und ein "echter" Toleranzmechanismus, angetrieben von der Anpassung des Stoffwechsels (Bailey-Serres & Voesenek, 2008). Pflanzen mit einer *Quiescence*-Strategie, z. B. die

Tieflandreissorte FR13A, Rumex acetosa und Rorippa sylvestris (Singh et al., 2001; Akman et al., 2012; van Veen et al., 2013), schränken energieaufwendige Prozesse ein und bewahren möglichst viel Energie und Kohlenhydrate bis zum Rückgang des Wassers (Fukao & Bailey-Serres, 2004; Fukao et al., 2006). Diese Pflanzenarten sind oft an Standorten zu finden, die nur selten oder nur kurzzeitig überflutet werden und/oder die Überflutungstiefe so groß ist, dass die Pflanze unmöglich aus dem Wasser herauswachsen kann (Voesenek et al., 2004). Eine negative Korrelation zwischen Überleben und Wachstum konnte auch in Tieflandreis gezeigt werden, wobei Genotypen, die während der Überflutung am meisten wuchsen, auch am schlechtesten überlebten (Singh *et al.*, 2001). Gleichzeitig verbesserten höhere Mengen an Kohlenhydraten vor und nach Überflutung die Überflutungstoleranz erheblich, da dies eine vorteilhafte Grundlage für das Wachstum nach der Überflutung bietet (Singh et al., 2001; Fukao & Bailey-Serres, 2008; Yeung et al., 2019). Während in Tiefwasserreis die Escape-Strategie von den GVII ERFs SNORKEL1 und SNORKEL2 abhängt (Hattori et al., 2009), wird in Tieflandreis die Quiescence-Strategie durch den GVII ERF SUBMERGENCE1A (SUB1A) vermittelt (Xu et al., 2006). Interessanterweise unterliegt SUB1A trotz eines N-terminalen MC-Motivs nicht der Regulation durch den Arginin/N-Degron Pathway (Gibbs et al., 2011; Lin et al., 2019). Sowohl SUB1A als auch SNORKEL1 und SNORKEL2 spielen für das Überleben von Reis bei Überflutung eine entscheidende Rolle (Xu et al., 2006; Hattori et al., 2009). Erstaunlicherweise müssen sich Vermeidungs- und Durchhaltestrategie nicht gegenseitig ausschließen: Lotus tenuis besitzt die Flexibilität, bei teilweiser Überflutung die Escape-Strategie und bei vollständiger Überflutung die Quiescence-Strategie anzuwenden (Manzur et al., 2009).

1.5 Einfluss von Phytohormonen auf morphologische Anpassungen

1.5.1 Die hormonelle Triade aus Ethylen, Abscisinsäure und Gibberellinsäure Der Hauptregulator der morphologischen und anatomischen Anpassungen ist Ethylen, das aufgrund seiner Gasform unter Wasser schnell und lichtunabhängig im Pflanzengewebe akkumuliert und somit ein zuverlässiges und frühes Signal für Überflutung darstellt (Sasidharan & Voesenek, 2015; Hartman *et al.*, 2019). Ethylen wird aus Methionin über die Vorstufe S-Adenosylmethionin (SAM) synthetisiert (Abb. 1) (Adams & Yang, 1977). Die Umwandlung von SAM zur Ethylenvorstufe 1-Aminocyclopropan-1-carbonsäure (ACC) wird durch das Enzym ACC-Synthase (Boller *et al.*, 1979) und die Oxidation von ACC zu Ethylen durch das Enzym ACC-Oxidase (Ververidis & John, 1991; Zhang *et al.*, 2004) katalysiert, wobei die ACC-Synthase als das geschwindigkeitsbestimmende Enzym angesehen wird (Yang & Hoffman, 1984; Kende, 1993). Ethylen stimuliert beispielsweise die Bildung von Adventivwurzeln und Aerenchymen (Jackson, 1985; Visser *et al.*, 1996; Mergemann & Sauter, 2000; Yamauchi *et al.*, 2014), aber auch die Bildung von aquatischen Blättern bei Heterophyllie (Kuwabara *et al.*, 2003; Horiguchi *et al.*, 2019). Interessanterweise reicht die Applikation von Ethylen aus, um die durch Überflutung hervorgerufene Elongations-reaktion in Tiefwasserreis und *Ru. palustris* nachzuahmen (Kende *et al.*, 1998; Benschop *et al.*, 2005).



Abb. 1 Ethylen-Biosyntheseweg. Ethylen wird ausgehend von Methionin über S-Adenosylmethionin (SAM) und 1-Aminocyclopropan-1-carbonsäure (ACC) gebildet. Vereinfachter Mechanismus adaptiert von Schaller & Kieber (2002) und van de Poel & van der Straeten (2014). Relevante Enzyme sind in Rot dargestellt. SAMS: SAM-Synthetase, ACS: ACC-Synthase, ACO: ACC-Oxidase.

In Reis und *Rumex* hängen sowohl die *Quiescence*- als auch die *Escape*-Strategie mit der Interaktion der hormonellen Triade aus Ethylen, Abscisinsäure (ABA) und Gibberellinsäure (GA) zusammen (Sasidharan & Voesenek, 2015). Die überflutungsinduzierte Akkumulation von Ethylen führt zum ABA-Abbau in Tiefwasserreis (Hoffmann-Benning & Kende, 1992) und *Ru. palustris* (Benschop *et al.*, 2005, 2006), aber nicht in *Ru. acetosa*, was die Annahme der *Quiescence*-Strategie in dieser Art erklärt (Benschop *et al.*, 2005).

ABA wird in den Chloroplasten aus β-Carotin über Zeaxanthin, Violaxanthin, 9-cis-Violaxanthin oder 9'-cis-Neoxanthin, Xanthoxin und ABA-Aldehyd synthetisiert (Abb. 2) (Finkelstein, 2013). Die Umwandlung von Zeaxanthin in Violaxanthin wird durch die ZEAXANTHIN EPOXIDASE (ZEP) katalysiert (Duckham *et al.*, 1991; Rock & Zeevaart, 1991). Die Bildung von Xanthoxin aus 9-cis-Violaxanthin oder 9'-cis-Neoxanthin ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt und wird durch das Enzym 9-*cis*-EPOXYCAROTINOID DIOXYGENASE (NCED) katalysiert (Schwartz *et al.*, 2003). Xanthoxin wird im Cytoplasma über die SHORT-CHAIN DEHYDROGENASE/REDUCTASE 1 (SDR1) weiter zu ABA-Aldehyd oxidiert (Cheng *et al.*, 2002). Der letzte Oxidationsschritt der ABA-Biosynthese wird durch ABSCISIC ALDEHYDE OXIDASE (AAO) katalysiert (Seo *et al.*, 2000). Die Inaktivierung von ABA erfolgt hauptsächlich durch die 8'-Hydroxylierung von ABA zu Phaseinsäure, katalysiert von ABA 8'-Hydroxylasen, den Cytochrom P450-Monooxygenasen CYP707As (Kushiro *et al.*, 2004).



Abb. 2 Abscisinsäure (ABA)-Biosynthese und Katabolismus. Vereinfachter ABA-Metabolismus adaptiert von Finkelstein (2013). Die Biosynthese erfolgt aus β -Carotin und die Inaktivierung erfolgt zu Phaseinsäure. Relevante Gene / Enzyme sind in Rot dargestellt. ZEP: ZEAXANTHIN EPOXIDASE, NCED: 9-*cis*-EPOXYCAROTINOID DIOXYGENASE, AAO: ABSCISIC ALDEHYDE OXIDASE, *ABA*-Gene: *ABSCISIC ACID DEFICIENT*, CYP707As: Cytochrom P450-Monooxygenasen / ABA 8'-Hydroxylasen, SDR1: SHORT-CHAIN DEHYDROGENASE/REDUCTASE 1, *ABA3*: codiert für eine Molybdän-Cofaktor (MoCo) Sulfurase.

In Tiefwasserreis und *Ru. palustris* führt Überflutung nicht nur zu einem raschen ABA-Abbau, sondern außerdem zu einem Anstieg von GA, was letztendlich die Elongation der Internodien oder Petiolen hervorruft (Hoffmann-Benning & Kende, 1992; Rijnders *et al.*, 1997; Benschop *et al.*, 2006). Die GA-Biosynthese in Tiefwasserreis wird durch ein funktionelles, Ethylen-induziertes Allel von *SEMIDWARF1* (*SD1*) vermittelt, während das nichtfunktionelle Allel *sd1* zu kleinwüchsigen Reispflanzen führt (Sasaki *et al.*, 2002; Kuroha *et al.*, 2018). Zusätzlich stimulieren SNORKEL1 und SNORKEL2 die GA-Biosynthese und/oder die GA-Sensitivität und somit die Elongation in Tiefwasserreis (Hattori *et al.*, 2009; Kuroha *et al.*, 2018). Im Gegensatz dazu unterdrückt SUB1A die GA-Biosynthese und das GA-vermittelte Wachstum im Tieflandreis durch die Induktion von SLENDER RICE1 (SLR1) und SLR LIKE-1 (SLRL1), den negativen Regulatoren der GA-Signalübertragung (Fukao & Bailey-Serres, 2008).

Die Synthese von bioaktiven Gibberellinen (GA₁, GA₃, GA₄, GA₇) erfolgt aus Geranylgeranyldiphosphat und benötigt drei Enzymklassen: Terpensynthasen, Cytochrom P450-Monooxygenasen und 2-Oxoglutarat-abhängige Dioxygenasen (Sun, 2008; Yamaguchi, 2008). Die Terpensynthasen CPS (*ent*-COPALYL DISPHOSPHATE SYNTHASE) und KS (*ent*-KAUREN SYNTHASE) katalysieren die Umwandlung von Geranylgeranyldiphosphat zu *ent*-Kauren (Sun & Kamiya, 1994; Yamaguchi *et al.*, 1998), welches dann über *ent*-Kaurensäure durch KO (*ent*-KAURENE OXIDASE) und KAO (*ent*-KAURENOIC ACID OXIDASE) zu GA₁₂ umgewandelt wird (Helliwell *et al.*, 1998, 2001). GA₁₂ wird durch GA20-Oxidasen (GA20ox) auf zwei parallelen Wegen zu den inaktiven Vorläufern GA₉ und GA₂₀ umgewandelt (Phillips *et al.*, 1995; Yamaguchi, 2008). Die bioaktiven GAs werden schließlich durch GA3-Oxidasen (GA3ox) synthetisiert (Chiang *et al.*, 1995). Die Umwandlung in die inaktive Form (GA₈, GA₂₉, GA₃₄, GA₅₁) erfolgt entweder an bioaktiven GAs oder deren inaktiven Vorläufern durch GA2-Oxidasen (GA2ox) (Thomas *et al.*, 1999).



Abb. 3 Gibberellinsäure (GA)-Biosynthese und Katabolismus. Vereinfachter Mechanismus des GA-Metabolismus, von Sun (2008) adaptiert. Relevante Enzyme sind in Rot dargestellt. Bioaktive GAs sind grau unterlegt. GGDP: Geranylgeranyldiphosphat, CPS: *ent*-COPALYL DIPHOSPHATE SYNTHASE, KS: *ent*-KAUREN SYNTHASE, KO: *ent*-KAUREN OXIDASE, KAO: *ent*-KAURENOIC ACID OXIDASE, GA200x/GA30x/GA20x: GA-Oxidasen.

1.5.2 Die Wachstumsregulatoren Auxin und Brassinosteroide

In mehreren Pflanzenarten konnte bereits eine Beteiligung des Phytohormons Auxin an der durch Überflutung hervorgerufenen Elongation nachgewiesen werden (Cookson & Osborne, 1978; Horton & Samarakoon, 1982; Cox *et al.*, 2004, 2006). Indol-3-essigsäure (*indol-3-acetic acid*, IAA), das wichtigste natürliche Auxin in Pflanzen, kann über einen Tryptophan-abhängigen oder einen Tryptophanunabhängigen Weg synthetisiert werden (Zhao, 2014). Dabei stellt der Tryptophan-abhängige Weg (Abb. 4) über das Zwischenprodukt Indol-3-pyruvat (IPA) den Hauptbiosyntheseweg in Pflanzen dar (Mashiguchi *et al.*, 2011; Zhao, 2014).



Abb. 4 Tryptophan-abhängiger Auxin-Hauptbiosyntheseweg. Indol-3-essigsäure (IAA) wird aus Tryptophan über das Zwischenprodukt Indol-3-pyruvat (IPA) synthetisiert. Vereinfachter Mechanismus adaptiert von Mashiguchi *et al.* (2011). Relevante Enzyme sind in Rot dargestellt. TAA: Tryptophanaminotransferase, YUC: YUCCA.

Tryptophan wird über die Tryptophanaminotransferase (TAA) in IPA umgewandelt (Stepanova *et al.*, 2008; Tao *et al.*, 2008) und der geschwindigkeitsbestimmende Schritt, die Umwandlung von IPA zu IAA, wird durch YUCCA (YUC)-Proteine katalysiert (Mashiguchi *et al.*, 2011; Dai *et al.*, 2013).

Neben den fünf klassischen Phytohormonen Auxin, Ethylen, ABA, GA und Cytokinin (Kende & Zeevaart, 1997) stellen Brassinosteroide (BRs) die sechste Klasse von Phytohormonen dar, welche etwa 70 Derivate (u. a. Brassinolid; BL) umfasst (Fujioka & Sakurai, 1997; Clouse, 2011; Peres *et al.*, 2019). BRs sind Wachstumsregulatoren, die an vielen Entwicklungsprozessen der Pflanze beteiligt sind, einschließlich Zellteilung, Zellstreckung, Samenkeimung, Blüte und Seneszenz (Bajguz, 2007). Interessanterweise konnte ein Zusammenhang zwischen BRs, GAs und der SUB1A-vermittelten Wachstumsunterdrückung in Reis identifiziert werden (Schmitz *et al.*, 2013). Dabei wird vermutet, dass SUB1A bei Überflutung die Konzentration von BRs erhöht, wodurch der Spiegel von bioaktiven GAs gesenkt und folglich das Wachstum unterdrückt wird (Schmitz *et al.*, 2013).

Ausgehend von Campesterol besteht der erste Schritt der Biosynthese von BL darin, Campestanol über das Enzym DET2 (DE-ETIOLATED 2) zu bilden (Li *et al.*, 1996; Fujioka *et al.*, 1997). Campestanol wird über zwei parallele Wege, abhängig von *DWF4* (*DWARF4*), *CPD* (*CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC DWARF*) und *ROT3* (*ROTUNDFOLIA 3*), zu Castasteron umgewandelt (Szekeres *et al.*, 1996; Fujioka & Sakurai, 1997; Choe *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 2005a). Brassinosteroid-6-Oxidasen (BR6ox) katalysieren mehrere Schritte in der BR-Biosynthese, u. a. auch den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Umwandlung von Castasteron zu BL (Shimada *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2005b). Die Inaktivierung von BRs kann über *BAS1* (*PHYB ACTIVATION-TAGGED SUPPRESSOR 1*) oder UDP-Glykosyltransferasen (UGTs) erfolgen (Neff *et al.*, 1999; Poppenberger *et al.*, 2005; Husar *et al.*, 2011).



Abb. 5 Brassinosteroid (BR)-Biosynthese und Katabolismus. Vereinfachter BR-Metabolismus adaptiert von Clouse (2011) und Fujioka & Yokota (2003). Relevante Gene / Enzyme sind in Rot dargestellt. Bioaktive BRs sind grau unterlegt. DET2: DE-ETIOLATED 2, DWF4: DWARF4, CPD: CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC DWARF, ROT3: ROTUNDFOLIA 3, BR6ox: Brassinosteroid-6-Oxidasen, BL: Brassinolid, UGT: UDP-Glykosyltransferase, BAS1: PHYB ACTIVATION-TAGGED SUPPRESSOR1.

1.6 Analyse von Wildpflanzen als Grundlage zur Erzeugung von toleranten Nutzpflanzen

In einem Bericht der Vereinten Nationen wird prognostiziert, dass die Weltbevölkerung von 7,7 Milliarden im Jahr 2019 auf 8,5 Milliarden im Jahr 2030 (Anstieg um 10 %), auf 9,7 Milliarden im Jahr 2050 (26 %) und auf 10,9 Milliarden im Jahr 2100 (42 %) ansteigt (United Nations, Department of Economic and Social Affairs, Population Division). Mit steigender Bevölkerung wächst auch der Bedarf an landwirtschaftlichen Produkten. Um die Nachfrage nach Getreide im Jahr 2050 zu decken, ist ein Anstieg von etwa 25 bis 70 % über das derzeitige Produktionsniveau nötig (Hunter *et al.*, 2017). Dieses Ziel stellt jedoch angesichts des globalen Klimawandels eine besondere Herausforderung dar, da besonders Dürre und Überflutung gleichermaßen zu großen Ernteverlusten führen (Bailey-Serres *et al.*, 2012b, 2019; Li *et al.*, 2019). Die schädlichen Auswirkungen von Überflutungsstress variieren jedoch zwischen den Pflanzenarten. Viele Nutzpflanzen (z. B. *Hordeum vulgare, Zea mays, Glycine max*) sind überflutungssensitiv, u. a. aufgrund des Fehlens von Aerenchymen (Mustroph, 2018a). Im Gegensetz dazu sind Pflanzen aus Überflutungsrisikogebieten (z. B. aus den Gattungen *Oryza, Rumex* und *Rorippa*) gut an Überflutung angepasst (Bailey-Serres & Voesenek, 2008; Mustroph, 2018a).

A. thaliana ist die am häufigsten studierte Modellpflanze und zeichnet sich besonders durch einen kurzen Lebenszyklus, eine geringe Pflanzengröße, ein relativ kleines Genom und eine effiziente Vermehrung durch Selbstbestäubung aus (Koornneef & Meinke, 2010). Obwohl bereits Unterschiede in der Überflutungstoleranz einiger *A. thaliana*-Ökotypen festgestellt wurden (Vashisht *et al.*, 2011), ist *A. thaliana* dennoch eher intolerant. Der LT₅₀-Wert (*lethal time*; Anzahl der Tage, bei der 50 % der untersuchten Population stirbt) ist bei Überflutung im Licht nur etwa 20 d (Vashisht *et al.*, 2011). Die Überflutungstoleranz bei nah verwandten Wildpflanzen der Gattung *Rorippa* liegen deutlich höher (Akman *et al.*, 2012; Sasidharan *et al.*, 2013). Die Gattung *Rorippa* gehört zur Brassicaceae-Familie und umfasst mehr als 80 Arten, darunter auch *R. amphibia*, *R. palustris* und *R. sylvestris* (Bleeker & Hurka, 2001; Al-Shehbaz *et al.*, 2006). *R. amphibia*, *R. palustris* und *R. sylvestris* sind polyploide, rosetten-förmig wachsende Arten, welche in verschiedenen Lebensräumen nahe Flussufern in Europa weit verbreitet sind (Bleeker & Hurka, 2001; Stift *et al.*, 2008; Sosnová & Klimešová, 2013). Der LT₅₀-Wert von *R. amphibia* liegt bei etwa 60 - 80 d und *R. sylvestris* überlebte sogar 100 d vollständig bei kompletter Überflutung und unter reduzierten Lichtbedingungen, wodurch beide Arten als extrem tolerant gelten (Akman *et al.*, 2012; Sasidharan *et al.*, 2013).

Die Reaktion von *R. sylvestris* und *R. amphibia* auf Überflutung wurde bereits auf molekularer Ebene in den Wurzeln untersucht und offenbarte im direkten Vergleich mit *A. thaliana* interessante Unterschiede und potenzielle Toleranzgene in den *Rorippa*-Arten (Sasidharan *et al.*, 2013). *R. sylvestris* ist ein Vertreter der *Quiescence*-Strategie, *R. amphibia* und *R. palustris* zeigen ein verstärktes Wachstum der Blütenstängel bei Überflutung (Stift *et al.*, 2008; Akman *et al.*, 2012; Sosnová & Klimešová, 2013). Studien zu *Rumex* und *Rorippa* haben bereits gezeigt, welches Potenzial in der Analyse von Überflutungsreaktionen der Wildpflanzen steckt. Es ist davon auszugehen, dass viele Wildpflanzen weitere, noch unbekannte Toleranzgene und -prozesse besitzen. Das Verständnis der Mechanismen zur Überflutungstoleranz von Wildpflanzen kann dazu beitragen, die Überflutungstoleranz von Nutzpflanzen zu verbessern (Voesenek *et al.*, 2014).

1.7 Zielsetzung

Bisher beschränkten sich molekulare Analysen zur Überflutungstoleranz hauptsächlich auf Reis bei monokotylen Pflanzen und auf *Ru. palustris* und *A. thaliana* bei dikotylen Pflanzen. Überflutungsadaptierte Mechanismen haben sich aber maßgeblich in Gebieten entwickelt, an denen weder Reis noch *A. thaliana* natürlich vorkommen (Voesenek *et al.*, 2014). Obwohl die zahlreichen Analysen von *Rumex*-Arten einen wesentlichen Beitrag zum Verständnis von Überflutungstoleranzmechanismen beigetragen haben, sind *Rumex*-Arten leider nicht genetisch zugänglich. Das Ziel dieser Arbeit war daher die Analyse von Überflutungstoleranzmechanismen sowie die Etablierung eines dikotylen, überflutungstoleranten und genetisch veränderbaren Modellpflanzensystems.

Der Vergleich von überflutungstoleranten Arten zur nah verwandten, aber relativ intoleranten Art *A. thaliana* stellt eine vielversprechende Möglichkeit zur Identifizierung einer solchen Modellpflanze dar. Das erste Ziel dieser Arbeit bestand darin, ausgewählte Vertreter von Wildpflanzen der Brassicaceae-Familie anhand ihrer Überflutungstoleranz und Überlebensstrategie einzuordnen. Zu den ausgewählten Pflanzenarten zählten *Cardamine hirsuta, Cardamine pratensis, Nasturtium officinale, Rorippa palustris* und *Rorippa sylvestris.* Während einige *Rorippa*-Arten bereits in den Fokus der Analysen zur Überflutungstoleranz traten, wurden einige *Cardamine-Arten* bisher nur auf ihre Toleranz gegenüber Staunässe getestet (Shimizu-Inatsugi *et al.*, 2017). Da der natürliche Lebensraum von einigen *Cardamine-*Arten nahe Feuchtgebieten ist (Marhold, 1994; Bleeker *et al.*, 2008; Prlić, 2015), stellen diese attraktive Kandidaten zur Analyse der Überflutungstoleranz dar. Des Weiteren ist *C. hirsuta* bereits ein Modellorganismus zur Untersuchung der explosionsartigen Samenverbreitung und der Blattformentwicklung (Hay & Tsiantis, 2006; Hofhuis *et al.*, 2016) und das kürzlich sequenzierte Genom wird in Zukunft weitere Zusammenhänge zwischen Genotyp und phänotypischer Variation ermöglichen (Gan *et al.*, 2016).

Bei Nasturtium officinale konnte ein verstärktes Stängelwachstum bei Überflutung beobachtet werden (Ridge, 1987; Bleeker et al., 1999; Mustroph, 2018b). N. officinale ist eine tetraploide, mehrjährige, selbstbefruchtende und weltweit vorkommende Pflanze, die auch Brunnenkresse oder Wasserkresse

genannt wird (Howard & Lyon, 1952; Bleeker *et al.*, 1999). Sie besitzt einen hohlen und stark verzweigten Stängel und bildet Adventivwurzeln an den Blattachseln aus. Wie der Name Brunnen- oder Wasserkresse vermuten lässt, bevorzugt die Tieflandart einen feuchten Lebensraum. Deshalb wächst sie vorwiegend in der Nähe von fließendem Gewässer (z. B. Flüsse, Bäche, Quellen), stehendes Wasser und Schatten sind allerdings schlecht für das Pflanzenwachstum (Howard & Lyon, 1952). Die Analyse von *N. officinale*-Pflanzen kann daher ebenfalls dazu beitragen, (Wachstums-) Mechanismen für das (Über-) Leben in Feuchtgebieten aufzuklären.

Bislang wurden Überflutungsmechanismen auf molekularer Ebene häufig in Wurzeln und/oder unter Überflutungsbedingungen in Dunkelheit untersucht (Lee *et al.*, 2011; Hsu *et al.*, 2013; Sasidharan *et al.*, 2013; van Veen *et al.*, 2016; Yeung *et al.*, 2018). Allerdings sind beispielsweise die *Quiescence-* und *Escape-*Strategie auf das Verhalten des Sprosses zurückzuführen. Zusätzlich tritt Überflutung nicht nur in vollständiger Dunkelheit auf, sondern kann abhängig von der Wassertiefe und der Wassertrübung auch teilweise im Licht erfolgen. Ein weiteres Ziel war daher die genomweite Analyse mittels RNA-Sequenzierung (RNA-seq) zur Identifizierung von induzierten und reprimierten Genen in den Blättern von im Licht überfluteten Pflanzen. Zusätzlich sollten die Reaktionen auf Überflutung auch auf physiologischer und metabolischer Ebene charakterisiert werden. Um einen tieferen Einblick in die Toleranzmechanismen zu erhalten, sollte außerdem der Einfluss eines ausgewählten Kandidatengens durch Überexpression in der intoleranten Art *A. thaliana* getestet werden. Gleichzeitig sollte durch die Etablierung eines Transformationssystems eine Möglichkeit geschaffen werden, die Funktion möglicher Kandidatengene durch zielgerichtete Abschaltung in den Wildpflanzen untersuchen zu können.

2. Material und Methoden

2.1 Organismen und Plasmide

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Pflanzenlinien und Bakterienstämme sowie Plasmide sind

in Tab. 1 dargestellt.

Tab. 1 Verwendete Pflanzenlinien, Bakterienstämme und Plasmide. B: Bakterien, C-term.: C-terminal, HA: Hämagglutinin, N-term.: N-terminal, NASC: Nottingham Arabidopsis Stock Center, OE: Überexpression, P: Pflanzen, p35S: *Cauliflower Mosaik Virus* (CaMV) 35S-Promotor, Resistenzen: Gentamycin (Gm^r), Hygromycin (Hyg^r), Kanamycin(Kan^r), Rifampicin (Rif^r).

Art / Bezeichnung	Merkmale / Eigenschaften	Herkunft / Literatur	
Pflanzenlinien			
Arabidopsis thaliana	Ökotyp Columbia (Col-0)	NASC	
Cardamine hirsuta	Wildtyp	MPI Köln (Prof. Miltos Tsiantis)	
Cardamine pratensis	Wildtyp	Templiner Kräutergarten, Templin	
Nasturtium officinale	Wildtyp	Saatgut-Vielfalt, Weilheim	
Rorippa amphibia	Wildtyp	Stift <i>et al.</i> (2008)	
Rorippa palustris	Wildtyp	Wilde Blumen OG, Regau, Österreich	
Rorippa sylvestris	Wildtyp	Stift <i>et al.</i> (2008)	
AtBCA3 OE-Linien	Col-0 Hintergrund, Hyg ^r	vorliegende Arbeit	
RsBCA3 OE-Linien	Col-0 Hintergrund, Hyg ^r	vorliegende Arbeit	
Bakterienstämme			
Escherichia coli	Stamm DH10β	Grant <i>et al.</i> (1990)	
Agrobacterium tumefaciens	Stamm GV3101, Gm ^r , Rif ^r	Koncz & Schell (1986)	
Plasmide			
Gateway Entry-Vektor	pDONR221	Invitrogen, Darmstadt	
Gateway Destination-Vektor	pMDC43-HA; N-term. 3x HA,	Curtis & Grossniklaus (2003)	
(binärer Pflanzenvektor)	2x p35S, Kan ^r (B), Hyg ^r (P)		
Gateway Destination-Vektor	pMDC83-HA; C-term. 3x HA,	Curtis & Grossniklaus (2003)	
(binärer Pflanzenvektor)	2x p35S, Kan ^r (B), Hyg ^r (P)		

2.2 Chemikalien

Das verwendete Wasser wurde vor Gebrauch über eine Advantage A10 Milli-Q-Anlage (Millipore, Billerica, MA, USA) deionisiert und gereinigt. Die verwendeten Oligonukleotide (Tab. A1) wurden von Invitrogen (Darmstadt, Deutschland) synthetisiert. Verwendete Antibiotika-Stammlösungen: 50 mg/ml Rifampicin (CAS Nr. 13292-46-1, Duchefa, Haarlem, Niederlande) in Dimethylsulfoxid (DMSO), 50 mg/ml Kanamycin (CAS Nr. 25389-94-0, Duchefa, Haarlem, Niederlande) in H₂O und 50 mg/ml Hygromycin (CP13.1, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe) in H₂O.

2.3 Nährstoffmedien

Die verwendeten Nährmedien für die Bakterien- und Pflanzenanzucht (siehe Kapitel 2.4, 2.5) sind in

Tab. 2 dargestellt.

Tab. 2 Zusammensetzung der verwendeten Nährmedien. Mengenangaben beziehen sich auf 1 l Gesamtvolumen. 2,4-D: 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure, CIM: Kallusinduktionsmedium, EDTA: Ethylendiamintetraacetat, LB: *lysogeny broth*, MS-Medium nach Murashige & Skoog (1962), Re-III: Regenerationsmedium nach Toki *et al.* (2006), YEB: *yeast extract broth*.

Medium	Mengenangaben (in 1 l Gesamtvolumen)
CIM	4,4 g MS-Salze (inkl. Vitamine), 0,05 % 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure (MES),
	3 % Saccharose, 1 mg 2,4-D (in Ethanol), 0,05 mg 6-Benzylaminopurin (in 1 N NaOH),
	pH 5,7, 0,7 % Plant Agar; 10 mg Thiamin-HCl, 1 mg Nicotinsäure, 1 mg Pyridoxin-HCl
LB	5 g Hefeextrakt, 10 g Trypton, 10 g NaCl, optional 15 g Agar
MS	4,4 g MS-Salze (inkl. Vitamine), 10 g Saccharose, pH 5,7 optional 10 g Plant Agar
½ MS	2,2 g MS-Salze (inkl. Vitamine), pH 5,7, optional 10 g Plant Agar
Nährstoffe	7,5 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ , 86,35 μ M Fe-EDTA, 0,9 mM MnSO ₄ xH ₂ O, 8 mM H ₃ BO ₃ , 15 mM
	KNO ₃ , 0,34 mM ZnSO ₄ x7H ₂ O, 0,06 mM CuSO ₄ x5H ₂ O, 0,1 mM Na ₂ MoO ₄ x2H ₂ O, 15 mM
	KH ₂ PO ₄
Re-III	30 g Saccharose, 30 g Sorbitol, 1,9 g KNO $_3$, 1,65 g NH $_4$ NO $_3$, 0,37 g MgSO $_4$ x7H $_2$ O, 0,44 g
	$CaCl_{2}x2H_{2}O, \ 0,17\ g \ KH_{2}PO_{4}, \ 37,3\ mg \ Na_{2}\text{-EDTA}, \ 27,8\ mg \ FeSO_{4}x7H_{2}O, \ 22,3\ mg$
	$MnSO_{4}x4H_{2}O, \ 8,6\ mg\ ZnSO_{4}x7H_{2}O, \ 0,025\ mg\ CuSO_{4}x5H_{2}O, \ 0,025\ mg\ CoCl_{2}xH_{2}O,$
	0,83 mg KI, 6,2 mg H ₃ BO ₃ , 0,25 mg Na ₂ MoO ₄ x2H ₂ O, 2 mg Glycin, 100 mg myo-Inisitol,
	0,5 mg Nicotinsäure, 0,5 mg Pyridoxin-HCl, 0,1 mg Thiamin-HCl, 0,02 mg NAA, 2 mg
	Kinetin (in 1 N NaOH), pH 5,8
YEB	10 g Pepton, 1 g Hefeextrakt, 5 g Saccharose, 0,5 g MgSO ₄ x7H ₂ O, optional 15 g Agar

2.4 Bakterienanzucht

2.4.1 Herstellung kompetenter E. coli Zellen

Zur Herstellung kompetenter Zellen wurden 100 ml LB-Medium mit 1 ml einer *E. coli* DH10β Übernacht (ÜN)-Kultur angeimpft. Die Zellen wurden bei 37 °C und 220 rpm kultiviert, bis eine optische Dichte bei 600 nm (OD₆₀₀) von 0,4-0,6 erreicht war. Die Kultur wurde für 10 min auf Eis inkubiert und anschließend für 10 min bei 4 °C und 2500*g* zentrifugiert. Das Pellet wurde unter sterilen Bedingungen in 10 ml 100 mM CaCl₂ resuspendiert und erneut für 5 min bei 4 °C und 1200*g* zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde unter sterilen Bedingungen in 2 ml 100 mM CaCl₂ und 15 % (w/v) Glycerin resuspendiert und für mindestens 30 min auf Eis inkubiert. Aliquots der Zellen wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.4.2 Herstellung kompetenter A. tumefaciens Zellen

Zur Herstellung kompetenter Zellen wurden 50 ml YEB-Medium (50 µg/ml Rifampicin) mit 2 ml einer *A. tumefaciens* GV3101 ÜN-Kultur angeimpft. Die Zellen wurden bei 28-30 °C und 250 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5-1,0 kultiviert. Die Kultur wurde auf Eis abgekühlt und anschließend für 5 min bei 4 °C und 3000g zentrifugiert. Das Pellet wurde unter sterilen Bedingungen in 1 ml 20 mM CaCl₂ resuspendiert. Aliquots der Zellen wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.4.3 Transformation von Bakterien

Kompetente *E. coli*-Bakterien (Stamm DH10β) wurden zunächst auf Eis aufgetaut. Zu 50 µl Bakteriensuspension wurden 1-2 µl Plasmid-DNA hinzugefügt und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einer Hitzestressbehandlung für 1 min bei 42 °C wurden 800 µl LB-Medium (siehe Tab. 2) hinzugegeben und die Bakteriensuspension 1 h bei 37 °C unter Schütteln inkubiert.

Kompetente *A. tumefaciens*-Bakterien (Stamm GV3101) wurden ebenfalls zunächst auf Eis aufgetaut. Zu 100 μ l Bakteriensuspension wurde 1 μ l Plasmid-DNA hinzugefügt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Nach einer Hitzestressbehandlung für 5 min bei 37 °C wurden 800 μ l YEB-Medium (siehe Tab. 2) hinzugefügt und die Bakteriensuspension für 2-4 h bei 30 °C unter Schütteln inkubiert. Die transformierten *E. coli-* und *A. tumefaciens*-Bakterien wurden für 4 min bei 1500*g* zentrifugiert, in 100 μ l LB- bzw. YEB-Medium resuspendiert und auf LB- bzw. YEB-Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum zur Selektion des transformierten Vektors ausplattiert.

2.5 Pflanzenanzucht und Pflanzentransformation

2.5.1 Wachstumsbedingungen und Zusammensetzungen der Erde

Zum Zweck der Vermehrung wurden die Pflanzen unter Langtagbedingungen (23 °C, 16 h / 8 h Licht / Dunkelheit, 100 µmol Photonen m⁻²s⁻¹) kultiviert. Dazu wurden die Pflanzen entweder auf Einheitspflanzenerde GS90 grobR (Einheitserde Werkverband, Sinntal-Jossa), Pikiererde (Okohum, Herbertingen) und Vermiculit (Deutsche Vermiculite Dämmstoff GmbH, Sprockhoevel) in einem Verhältnis von 3:3:1 (2 h bei 80 °C pasteurisiert) oder auf einem Erde-Sand-Kalk-Gemisch angezogen. Dieses bestand aus Erde (Vermehrungssubstrat Vliestopf SP VM Vlies, Einheitserdewerke Patzer Gebr. Patzer GmbH & Co. KG, Sinntal-Altengronau) und Sand (Go/On Spielsand Sandkastensand, hagebau Spree-Neiße Baustoffhandelsgesellschaft mbH, Cottbus) im Verhältnis 2:1 und wurde mit 3 g/l Harzer Dolomitkalk (Vereinigte Kreidewerke Dammann, Söhlde) und 1 l Nährstofflösung (siehe Tab. 2) pro 45 Pflanztöpfe (6x5x5 cm, 125 ml) versetzt. Überflutungsexperimente wurden unter Kurztagbedingungen an der Universität Bayreuth (23 °C, 8 h / 16 h Licht / Dunkelheit, 100 µmol Photonen m⁻²s⁻¹) oder an

der Universität Utrecht (23 °C, 9 h / 15 h Licht / Dunkelheit, 150 μ mol Photonen m⁻²s⁻¹) durchgeführt. Für Überflutungsexperimente wurden die Pflanzen auf obigem Erde-Sand-Kalk Gemisch angezogen.

2.5.2 Anzucht aus Samen in Sterilkultur

Für die Anzucht von *A. thaliana, C. hirsuta* und *R. palustris* in Sterilkultur wurden die Samen zunächst sterilisert. Zur Oberflächensterilisation wurden die Samen dazu 45 min in einer Chlorgasatmosphäre (10 ml Natriumhypochlorit, 5 ml 37 %-ige Salzsäure) in einem Exsikkator inkubiert. Zur Flüssigsterilisation wurden die Samen zunächst in einer 0,1 %-igen Tween-20 Lösung für 20 min inkubiert. Anschließend erfolgte die Sterilisation in einer Lösung aus 0,1 % Tween-20 und 5 % Natriumhypochlorit für 10 min. Darauf folgten 5 Waschschritte mit sterilem H₂O. Die sterilisierten Samen wurden unter sterilen Bedingungen auf MS-Medium (Tab. 2) verteilt. Zur Stratifizierung wurden die Samen 1-3 d bei 4 °C in Dunkelheit inkubiert. Die Keimung der Samen erfolgte anschließend in einem Klimaschrank unter Langtagbedingungen.

2.5.3 Vegetative Propagation

Die Vermehrung von *R. amphibia* und *R. sylvestris* erfolgte vegetativ über Rhizomfragmente. Dazu wurden die Wurzeln von mindestens 8 Wochen-alten Pflanzen gewaschen und in 3-4 cm lange Stücke geschnitten. Diese wurden in einer 10 %-igen Natriumhypochlorit-Lösung für 8 min sterilisiert. Nach dreimaligem Waschen mit sterilem H₂O wurden die Wurzelstücke auf MS-Medium ausgelegt und für 10-12 d unter Langtagbedingungen kultiviert. Nach dem Austreiben kleiner Pflanzen aus den Wurzelstücken wurden einzelne Triebe auf ein Erde-Sand-Kalk-Gemisch überführt (siehe 2.5.1).

2.5.4 Stabile Pflanzentransformation mit A. tumefaciens

Die stabile Transformation von *A. thaliana* erfolgte mittels *floral dip*-Methode (Clough & Bent, 1998). Die Anzucht der Agrobakterien erfolgte in 50 ml YEB-Medium (siehe Tab. 2) mit den Antibiotika zur Selektion des binären Vektors und des Helferplasmids ÜN bei 200 rpm und 30 °C. Nach Zentrifugation bei 4 °C und 3220*g* für 20 min wurden die Bakterien bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8 in 5 % (w/v) Saccharose resuspendiert. Direkt nach der Zugabe von 0,02 % (v/v) Silwet L-77 wurden die Blüten für ca. 5 min in die Suspension unter leichtem Schwenken eingetaucht. Um eine hohe Luftfeuchtigkeit zu gewährleisten, wurden die Pflanzen in Plastikfolie eingehüllt und ÜN in Dunkelheit inkubiert. Die Pflanzen wurden anschließend 4 Wochen bis zur Reifung der Samen unter Langtagbedingungen kultiviert. Die Selektion positiver Transformanten erfolgte auf ½ MS-Medium (siehe Tab. 2) mit entsprechendem Antibiotikum, dessen Resistenzgen auf der T-DNA enthalten war.

2.5.5 Kallus- und Sprossinduktion

Wurzelstücke von *R. sylvestris* wurden flüssig sterilisiert (siehe 2.5.3) und sterile Pflanzentriebe auf MS-Medium in 850 ml Glasgefäßen unter Langtagbedingungen und sterilen Bedingungen kultiviert. Nach etwa 4 Wochen wurden 0,5 cm-große Teile von Spross und Wurzel auf Kallusinduktionsmedium (CIM; siehe Tab. 2) ausgelegt und weiter unter Langtagbedingungen inkubiert. Nach weiteren 4 Wochen wurden die Kalli zur Sprossinduktion auf das Regenerationsmedium Re-III (siehe Tab. 2) überführt.

2.6 Stressbehandlungen

2.6.1 Überflutungsbedingungen

Sämtliche Überflutungsexperimente wurden 2 h nach Beginn der Lichtperiode gestartet. Mindestens einen Tag vor Beginn der Experimente wurden transparente Boxen (groß: 53x44x28 cm, 50 l; klein: 35x27x21, 13,5 l) mit Leitungswasser befüllt, sodass sich die Wassertemperatur der Umgebungstemperatur der Klimakammer anpasste. Die Kontrollpflanzen wurden ebenfalls in transparente Boxen gestellt und normal bewässert. Es wurden folgende Entwicklungsstadien als Startpunkte für Überflutungsexperimente definiert: 10 Blatt-Stadium für *A. thaliana* sowie 6 Blatt-Stadium für *C. hirsuta, C. pratensis, N. officinale, R. palustris* und *R. sylvestris,* wobei die Keimblätter nicht mitgezählt wurden. Da das Pflanzenwachstum nicht immer gleichmäßig erfolgte, wurden auch Pflanzen mit ± 1 Blatt ausgewählt, wobei darauf geachtet wurde, dass diese homogen auf alle Zeitpunkte und Bedingungen verteilt wurden. Unabhängig von der genauen Anzahl der Blätter befanden sich alle Pflanzen im gleichen Entwicklungsstadium, in der vegetativen Phase.

2.6.2 Nachweis der Überlebensstrategie

Das Überflutungsexperiment erfolgte wie unter 2.6.1 beschrieben. Zum Nachweis der Überlebensstrategie wurde die Blattlänge des jüngsten Blattes (für *A. thaliana, C. hirsuta, C. pratensis, R. palustris und R. sylvestris*) bzw. die Stängellänge und die Länge der Petiole des jüngsten Blattes (für *N. officinale*) mit einem digitalen Messschieber bestimmt. Die Überflutungs- und Kontrollpflanzen wurden vor dem Start des Experiments (t₀) und am Ende des Experiments (t_x) vermessen. Das absolute Wachstum wurde bestimmt als t_x-t₀. Die Bestimmung der Wachstumsgeschwindigkeit von Stängel und Hypokotyl bei *N. officinale* erfolgte gemäß Benschop *et al.* (2005).

2.6.3 Überleben nach Überflutung

Das Überflutungsexperiment erfolgte wie unter 2.6.1 beschrieben. Zu Beginn wurden 56 Pflanzen pro Spezies überflutet. Es wurde wöchentlich frisches Leitungswasser hinzugegeben, um einen möglichst
konstanten Wasserspiegel zu halten. Pro Zeitpunkt wurden 8 zufällig ausgewählte Pflanzen aus der Überflutungsbox herausgenommen und für 2 Wochen in der Klimakammer zur Erholung inkubiert. Die Fähigkeit zur Bildung neuer Blätter wurde dabei als Indikator für das Überleben definiert.

2.6.4 Behandlung mit Phytohormonen und deren Inhibitoren

Die Konzentration der Lösungsmittel (Ethanol oder DMSO) in den mock-Lösungen (zum Besprühen oder im Überflutungswasser) betrug maximal 0,1 % (v/v). ABA (CAS Nr. 21293-29-8, Duchefa, Haarlem, Niederlande) wurde in Ethanol zu einer Stammkonzentration von 100 mM gelöst und weiter mit Ethanol (1 ml Endvolumen) verdünnt. Die Pflanzen wurden in Leitungswasser überflutet, welches Endkonzentrationen von 0 μ M, 0,5 μ M, 1 μ M, 5 μ M und 10 μ M ABA (in jeweils 1 ml Ethanol) enthielt. Der GA-Biosyntheseinhibitor Paclobutrazol (PAC; CAS Nr. 76738-62-0, Duchefa, Haarlem, Niederlande) wurde in Ethanol zu einer Stammkonzentration von 100 mM gelöst und mit H2O zu einer Endkonzentration von 10 μM und 100 μM verdünnt. Die Vorbehandlung der Pflanzen erfolgte durch das Gießen der einzelnen Pflanztöpfe mit entweder 5 ml 10 µM bzw. 100 µM PAC oder 5 ml mock-Lösung (Ethanol) 18 h vor dem Start des Überflutungsexperiments. Gibberellinsäure GA3 (CAS Nr. 77-06-5, Duchefa, Haarlem, Niederlande) wurde ebenfalls in Ethanol zu einer Stammkonzentration von 100 mM gelöst. Die vorbehandelten Pflanzen wurden entweder in Leitungswasser mit mock-Lösung (Ethanol) oder mit 10 µM GA3 überflutet. Ethylen wurde gasförmig mit einer Konzentration von 2-4 ppm durch 10 | Durchflußgefäße appliziert. ACC (A3903, Sigma-Aldrich, Taufkirchen) wurde zu einer Stammkonzentration von 10 mM in 10 % (v/v) Ethanol gelöst. Die Applikation von ACC erfolgte als 100 µM-Lösung durch Besprühen der Pflanzen zu Beginn des Experiments. Der Ethyleninhibitor 1-Methylcyclopropen (1-MCP; SmartFresh[™]) wurde zu einer Konzentration von 10 ppm in H₂O gelöst. Die Pflanzen wurden vor Beginn des Experiments mit dem entstandenen Gas für 1 h in geschlossenen Glasexsikkatoren vorbehandelt. Um Feuchtigkeitseffekte zu kontrollieren, wurden die Kontrollpflanzen ebenfalls für 1 h in einen separaten Glasexsikkator gestellt. Der Ethylenbiosyntheseinhibitor Aminoethoxyvinylglycin (AVG; [S]-trans-2-amino-4-(2-aminoethoxy)-3-butenoic acid hydrochloride; 06665, Sigma Aldrich, Taufkirchen) wurde zu einer Konzentration von 50 μ M in H₂O gelöst. Die Anwendung erfolgte 18 h und 1 h vor Beginn des Überflutungsexperiments durch Besprühen der Pflanzen. Der Inhibitor der ABA-8'-Hydroxylasen Abscinazole-E3M (Abz-E3M; erhalten von Prof. Yasushi Todoroki und Dr. Jun Takeuchi, Shizuoka Universität, Japan) wurde in DMSO zu einer Stammkonzentration von 100 mM gelöst und als 50 μM bzw. 100 μM Lösung in H₂O zum Besprühen der Pflanzen (18 h und 1 h vor Überflutung) verwendet. Der BR-Biosyntheseinhibitor Brassinazole (BRZ; SML1406, Sigma-Aldrich, Taufkirchen) wurde in DMSO zu einer Konzentration von 5 mg/ml gelöst. Die Pflanzen wurden 18 h und 1 h vor Überflutung mit 20 μM BRZ oder mock-Lösung (DMSO) besprüht. Der Auxin-Transportinhibitor Naptalam (NPA, Chem Service, West Chester, PA, USA) wurde in DMSO

24

zu einer Stammlösung von 50 mM gelöst. Die Pflanzen wurden 18 h und 1 h vor Überflutung mit 50 μ M NPA oder mock-Lösung (DMSO) besprüht. Das synthetische Auxin 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D, CAS Nr. 94-75-7, Duchefa, Haarlem, Niederlande) wurde in Ethanol zu einer Stammlösung von 50 mM gelöst. Die Pflanzen wurden entweder in Leitungswasser mit mock-Lösung (Ethanol) oder mit 5 μ M 2,4-D überflutet.

2.6.5 Messung des Sauerstoffgehalts und der Dunkelatmung

Die Bestimmung des O₂-Gehaltes in Geweben von *N. officinale*-Stängeln und Petiolen erfolgte gemäß Herzog & Pedersen (2014) und die Dunkelatmung gemäß Colmer & Pedersen (2008a). Beides wurde als Kooperation an der Universität Kopenhagen (Dänemark) von Prof. Ole Pedersen durchgeführt.

2.7 Molekularbiologische und analytische Methoden

2.7.1 Isolierung von genomischer DNA aus Pflanzenmaterial

Zur Isolierung der genomischen DNA (gDNA) wurden ca. 50 mg Pflanzenmaterial in flüssigem Stickstoff schockgefroren und mittels einer Kugelmühle 1-2 min zermahlen. Das pulverisierte Pflanzenmaterial wurde in 500 μ l DNA-Extraktionspuffer (50 mM EDTA pH 8,0, 100 mM TRIS/HCl pH 8,0, 500 mM NaCl, 0,2 % (v/v) SDS) gelöst und die Proben für 30 min bei 65 °C inkubiert. Nach Zugabe von 500 μ l Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) wurden die Proben 30 s gevortext und anschließend für 10 min bei 16000*g* zentrifugiert. Zur Fällung der gDNA wurde die zuvor separierte, obere Phase mit 500 μ l Isopropanol versetzt und für 10 min inkubiert. Nach einem Zentrifugationsschritt (16000*g*, 15 min) wurde der Überstand dekantiert und das DNA-Pellet mit 800 μ l 70 % (v/v) Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert (16000*g*, 7 min). Der Überstand wurde verworfen und das DNA-Pellet für 5-10 min getrocknet. Nach Zugabe von 50 μ l H₂O wurde die gDNA ca. 10 min bei 65 °C inkubiert und durch Schnipsen gelöst und bei 4°C oder -20 °C gelagert.

2.7.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus transformierten *E. coli* Zellen wurde mittels GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe) gemäß Herstellerangaben durchgeführt.

2.7.3 Isolierung von Gesamt-RNA aus Pflanzenmaterial

Zur Isolierung der Gesamt-RNA wurden ca. 50 mg Pflanzenmaterial in flüssigem Stickstoff schockgefroren und mittels einer Kugelmühle 1-2 min zermahlen. Das pulverisierte Pflanzenmaterial wurde in 500 µl TRIsure[™] (Bioline GmbH, Luckenwalde) homogenisiert und für 5 min inkubiert. Nach der Zugabe von 100 µl Chloroform wurden die Proben 15 s kräftig geschüttelt, 2-3 min inkubiert und anschließend zentrifugiert (12000*g*, 15 min, 4 °C). Zur Fällung der RNA wurde die obere Phase separiert und mit 250 µl Isopropanol versetzt, für 10 min inkubiert und anschließend zentrifugiert (12000*g*, 10 min, 4 °C). Das Pellet wurde mit 750 µl 75 % Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert (7500*g*, 5 min, 4 °C). Anschließend wurde das Pellet für 5-10 min getrocknet. Nach Zugabe von 20-50 µl H₂O wurde das Pellet durch Auf- und Abpipettieren, Einfrieren bei -20°C und Inkubation für 10 min bei 55-60 °C gelöst. Die Lagerung der RNA erfolgte bei -20°C.

2.7.4 cDNA-Synthese aus Gesamt-RNA

Zunächst erfolgte eine Konzentrationsbestimmung der RNA durch Messung der Absorption bei 260 nm an einem Nanophotometer (IMPLEN GmbH, München). Die Synthese der komplementären DNA (cDNA) erfolgte mit der RevertAid[™] M-MuLV Reverse Transkriptase nach Herstellerangaben, wobei pro Ansatz 1-2 µg RNA eingesetzt wurden (Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe). Die cDNA wurde bei 4 °C gelagert.

2.7.5 Probenvorbereitung für Gesamt-Transkriptom-Shotgun-Sequenzierung (RNA-seq) Das Überflutungsexperiment erfolgte wie unter 2.6.1 beschrieben. Nach 1 d und 2 d wurde folgendes Pflanzenmaterial geerntet: für *A. thaliana* Col-0 wurden alle Blätter ab Blatt # 6 geerntet, für *C. hirsuta, C. pratensis, R. palustris* und *R. sylvestris* alle Blätter ab Blatt # 5 und für *N. officinale* der Stängel ab den Keimblättern und sämtliche Petiolen (außer die der Keimblätter). Dabei wurden für jeden Zeitpunkt und Bedingung jeweils fünf Pflanzen vereint. Für jede Probe wurde das Frischgewicht nach Einfrieren in flüssigem Stickstoff bestimmt. Die Vorbereitung der Proben und die Sequenzierung wurden als Kollaboration von Dr. Melis Akman (UC Davis und UC Berkeley, Kalifornien, USA) durchgeführt. Das gefrorene Pflanzenmaterial wurde in 2 ml-Gefäßen mit Zirconia/Silica-Kügelchen für 3 min in einem Mini-Beadbeater (BioSpec Products, Bartlesville, OK, USA) homogenisiert. Danach wurde 1 ml *Lysis Binding Buffer* (Dynabeads mRNA Direct Kit, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) hinzugefügt und für weitere 2 min mit einem Beadbeater homogenisiert. Die Proben wurden 3 min bei 10000 rpm zentrifugiert und auf eine Homogenisierungssäule (Omega Bio-Tek, Norcross, GA, USA) überführt, um durch Zentrifugation überschüssiges Gewebe abzutrennen. Die Lysate wurden in eine 96-*well*-Platte überführt und bei -80°C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert.

Die RNA-seq-Bibliotheken wurden mittels BrAd-seq Protokoll für nicht-strangspezifische Bibliotheken (Townsley *et al.*, 2015) hergestellt. Dazu wurden 200 µl Lysat zur Isolierung der mRNA verwendet (Dynabeads mRNA Direct Kit, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Die isolierte mRNA wurde

im RT Puffer (RevertAid RT Enzym, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) für 90 s bei 94 °C fragmentiert. Die Synthese des ersten cDNA-Strangs erfolgte an fragmentierter mRNA, die Synthese des zweiten cDNA-Strangs erfolgte anhand des BrAd-seq Protokolls, gefolgt von einer Adapterligation. Mittels barcodierten Oligonukleotiden für *Multiplexing* erfolgte eine Anreicherung der cDNA. Nach Aufreinigung wurde die Konzentration der Proben bestimmt (mit SYBR Green I Nucleic Acid Gel Stain, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) und für das *Multiplexing* angepasst. Das *Multiplexing* erfolgte zufällig und die Proben wurden erneut mittels Bioanalyzer auf Kontaminationen und Größe getestet. Die Größe der Fragmente variierte zwischen 200 und 500 bp. Die Proben wurden schließlich mittels Illumina, Hiseq4000 mit 100 bp im *paired end*-Modus sequenziert.

2.7.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

2.7.6.1 Amplifizierung von gDNA und cDNA

Die Amplifizierung von gDNA und cDNA mittels PCR erfolgte unter Verwendung der Taq-Polymerase oder der Phusion[™] High-Fidelity-Polymerase (Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe). Zur Amplifizierung von gDNA und cDNA als semiquantitativer Nachweis wurde die Taq-Polymerase und zur *Gateway*-Klonierung (siehe 2.7.9) und Sequenzierung die Phusion[™] High-Fidelity-Polymerase verwendet. Die Zusammensetzung der Reaktionsansätze sind in Tab. 3 und das Amplifizierungsschema in Tab. 4 zusammengefasst. Die zur Amplifizierung verwendeten Oligonukleotide (Primer) sind in Tab. A1 dargestellt.

	Taq-Polymerase	Phusion [™] Polymerase
H ₂ O	19,75 μl	33 µl
40 mM dNTPs	0,5 μl	0,5 μl
Puffer	2,5 μl (10x PCR-Puffer)	10 μl (5x HF- <i>Buffer</i>)
Primer <i>forward</i>	0,5 μl	2,5 μl
Primer <i>reverse</i>	0,5 μl	2,5 μl
DNA	1 µl	1 μΙ
Polymerase	0,25 μl	0,5 μl

Tab. 3 Reaktionsansatz der PCR unter Verwendung der Taq- bzw. Phusion™ High-Fidelity-Polymerase. Der verwendete 10x PCR-Puffer (500 mM KCl, 15 mM MgCl 2, 100 mM TRIS pH 9,0, 1 % (v/v) Triton X-100) sowie die Taq-Polymerase wurden am Lehrstuhl für Pflanzenphysiologie der Universität Bayreuth hergestellt; dNTPs: Desoxyribunukleosidtriphosphate.

		<u>Taq</u> .	-Polymerase		Phusion [™] Polymerase			
Scl	nritt	Temperatur Dauer Z		Zyklen	Temperatur	Dauer	Zyklen	
1.	Initiale Denaturierung	94 °C	3 min	1 x	98 °C	1 min	1 x	
2.	Denaturierung	94 °C	30 s	28-34 x	98 °C	15 s	38-40 x	
3.	Primerhybridisierung	54 °C	30 s	28-34 x	T _m + 3 °C	30 s	38-40 x	
4.	Polymerisation	72 °C	1 min/kb	28-34 x	72 °C	1 min/kb	38-40 x	
5.	Finale Polymerisation	72 °C	5 min	1 x	72 °C	5 min	1 x	
6.	Abkühlung	14 °C	∞	1 x	14 °C	8	1 x	

Tab. 4 Amplifizierungsschema der PCR unter Verwendung der Taq- bzw. Phusion™ High-Fidelity-Polymerase. Dargestellt sind Dauer, Anzahl der Zyklen und verwendete Temperatur (T_m=Schmelztemperatur) der einzelnen Schritte der PCR.

2.7.6.2 Quantitative Echtzeit-PCR (qRT-PCR)

Das Überflutungsexperiment zur zeitabhängigen Expressionsanalyse in *N. officinale*-Pflanzen erfolgte wie unter 2.6.1 beschrieben. Nach 0,5 h, 3 h, 6 h, 8 h, 24 h und 48 h wurde das älteste Internodium (Stängel ab den Keimblättern bis zu den ersten Blättern) sowie sämtliche Petiolen (außer die der Keimblätter) geerntet. Dabei wurden für jeden Zeitpunkt und Bedingung jeweils fünf Pflanzen vereint. Die Extraktion der RNA erfolgte wie unter 2.7.3 beschrieben. Es wurden 1 µg RNA einer Behandlung mit Desoxyribonuklease (DNAse I) gemäß Herstellerangaben unterzogen (Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe) und anschließend zur cDNA-Synthese (2.7.4) eingesetzt.

Die cDNA wurde 1:25 und die Primer 1:200 (Endkonzentration 0,5 µM) mit H₂O verdünnt. Die zur Amplifizierung verwendeten Primer sind in Tab. A1 dargestellt. Pro Ansatz wurden 2,5 µl cDNA, 2,5 µl Primermix sowie 5 µl SsoAdvanced[™] Universal SYBR[®] Green Supermix (Bio-Rad, Feldkirchen) eingesetzt. Die Detektion erfolgte mittels CFX Connect[™] Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, Feldkirchen). Das Amplifizierungsschema ist in Tab. 5 dargestellt.

Schritt	Temperatur	Dauer
1. Initiale Denaturierung	95 °C	3 min
2. Denaturierung	95 °C	10 s
3. Primerhybridisierung, Polymerisation	60 °C	40 s
4. Denaturierung	95 °C	10 s
5. Schmelzkurve	65 - 95 °C (0,5 °C pro Schritt)	5 s pro Schritt

Tab. 5 Amplifizierungsschema der qRT-PCR. Dargestellt sind die Dauer und die verwendete Temperatur der einzelnen Schritte der qRT-PCR. Die Schritte 1, 4 und 5 erfolgten jeweils nur 1 x, während Schritte 2 und 3 39 x wiederholt wurde.

Das relative Expressionslevel wurde mittels der 2-^{ΔCT} *1000-Methode (Livak & Schmittgen, 2001) berechnet. Die Normalisierung erfolgt für *N. officinale*-Stängelproben gegen den Mittelwert der Expression von *CAP-BINDING PROTEIN 20* (*CBP20*, AT5G44200) und *Ribosomal protein L13e family protein* (*RPL13e*, AT5G23900) und für *N. officinale*-Petiolenproben gegen den Mittelwert der Expression von *CYCLOPHILIN 57* (*CYP57*, AT4G33060) und *uncharacterized protein family* (*UPF0041*, AT4G22310).

2.7.7 Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte mithilfe von 1 % TAE-Agarosegelen in 1xTAE (40 mM TRIS, 1 mM EDTA, 20 mM Essigsäure). Die Proben wurden mit 6x DNA Loading Dye (MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Roth) versetzt. Als Größenstandard diente GeneRuler[™] 1kb DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe), wovon 6 µl aufgetragen wurden. Die Färbung der PCR-Produkte erfolgte mit 1 µl SERVA DNA Stain G (SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg) pro 50 ml Gelvolumen. Die Detektion und Dokumentation der DNA erfolgte unter UV-Licht (INTAS, MW 312 nm; Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen).

2.7.8 DNA-Aufreinigung und Sequenzierung

Die Reinigung von PCR-Produkten oder DNA nach Restriktionsverdau erfolgte mittels GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe) gemäß Herstellerangaben. Die Sequenzierung der gereinigten DNA erfolgte durch die Firma Macrogen (Amsterdam, Niederlande).

2.7.9 *Gateway*-Klonierung und Restriktionsverdau

Zunächst erfolgte eine Amplifizierung der cDNA unter Verwendung der PhusionTM-Polymerase (siehe 2.7.6.1) und genspezifischen Primern (Tab. A1). Das PCR-Produkt wurde aufgereinigt (siehe 2.7.8) und anschließend für eine weitere PCR mit PhusionTM-Polymerase und att-Primern (Tab. A1) eingesetzt. Nach der Aufreinigung wurden 3 μ l des entstandenen PCR-Produkts mit 1 μ l pDONR221 (Tab. 1) und 1 μ l BP-Clonase versetzt und ÜN inkubiert. Am nächsten Tag wurden 0,5 μ l Proteinase K hinzugegeben, der Ansatz für 10 min bei 37 °C inkubiert und in *E. coli* transformiert (siehe 2.4.3). Anschließend wurde die Plasmid-DNA (*Entry*-Vektor) isoliert (siehe 2.7.2). Es folgte ein Restriktionsverdau des *Entry*-Vektors, da sowohl der *Entry*-Vektor (pDONR221, Tab. 1) als auch die *Destination*-Vektoren (pMDC43-HA, pMDC83-HA, Tab. 1) eine Kanamycin-Resistenz besitzen. Dazu wurden 13,5 μ l Plasmid-DNA, 30,5 μ l H₂O, 5 μ l *Reaction buffer R* und 1 μ l Restriktionsenzym Pvul für 4 h bei 37 °C inkubiert und der Ansatz anschließend aufgereinigt (siehe 2.7.8). Für die LR-Reaktion wurden dann 1 μ l verdaute *Entry*-

Plasmid-DNA, 2 μ l *Destination*-Vektor, 1 μ l LR-Clonase und 1 μ l H₂O zusammengefügt und ÜN inkubiert. Am nächsten Tag wurde 0,5 μ l Proteinase K hinzugegeben, der Ansatz für 10 min bei 37 °C inkubiert und in *E. coli* transformiert (siehe 2.4.3). Anschließend wurde die Plasmid-DNA isoliert (siehe 2.7.2).

2.7.10 Bestimmung von Zucker- und Stärkegehalten

Das Überflutungsexperiment erfolgte wie unter 2.6.1 beschrieben. Es wurde folgendes Pflanzenmaterial geerntet: für *A. thaliana* Col-O wurden alle Blätter ab Blatt # 6 geerntet, für *C. hirsuta*, *C. pratensis*, *R. palustris* und *R. sylvestris* alle Blätter ab Blatt # 5 und für *N. officinale* der Stängel ab den Keimblättern und sämtliche Petiolen (außer die der Keimblätter). Dabei wurden für jeden Zeitpunkt und Bedingung jeweils fünf Pflanzen vereint. Für jede Probe wurde das Frischgewicht nach Einfrieren in flüssigem Stickstoff bestimmt. Das gefrorene Pflanzenmaterial (ca. 100 mg) wurde fein pulverisiert und in 0,5 ml 0,83 N Perchlorsäure homogenisiert. Nach Zentrifugation für 15 min bei 16000g und 4°C wurde der Überstand mit 125 μ l 1 M Bicin und 75 μ l 4 M KOH neutralisiert. Die Extrakte wurden erneut für 10 min bei 16000g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde zur Bestimmung der löslichen Zucker verwendet, während das Pellet zur Stärke-Extraktion weiterverwendet wurde. Dazu wurde das Pellet nach zweimaligem Waschen mit 600 μ l 80 % Ethanol mit 200 μ l 0,2 M KOH versetzt und 1 h bei 95 °C inkubiert. Nach Zentrifugation für 15 min bei 10000g wurde der Überstand mit 40 μ l 1 N Essigsäure neutralisiert. Anschließend wurden 50 μ l dieses Extraktes mit 100 μ l 50 mM Natriumacetatpuffer (pH 5) und 0,5 U Amyloglucosidase ÜN bei 55 °C inkubiert.

Die Zuckerbestimmung erfolgte photometrisch bei 340 nm anhand der Umwandlung von NAD zu NADH durch die Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase. Dazu wurden 20 µl des Extrakts mit 785 µl Mastermix, bestehend aus 0,1 M Imidazolpuffer pH 6,9 mit 0,5 M MgCl₂, 1 mM ATP, 0,5 mM NAD und 1 U Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase, versetzt und die Absorption über einen Zeitraum von etwa 10 min verfolgt. Anschließend wurden in weiteren Schritten die Absorption durch Zugabe von 0,5 U Hexokinase (Endbestimmung Glucose), 0,2 U Phosphoglucose-Isomerase (Endbestimmung Fructose) und 60 U Invertase (Endbestimmung Saccharose) so lange bestimmt, bis keine Absorptionsänderung mehr erfolgte. Die Bestimmung des Stärkegehaltes erfolgte durch Messung der Glucosegehalte.

2.7.11 Bestimmung des ABA-Gehalts aus Pflanzenmaterial

Das Überflutungsexperiment erfolgte wie unter 2.6.1 beschrieben. Das Pflanzenmaterial wurde zu Beginn des Experiments (0 h) und nach 1,5 h, 5 h und 8 h von Kontroll-und Überflutungspflanzen geerntet. Für jede Probe wurden die Stängel (ab den Keimblättern) und sämtliche Petiolen (außer die der Keimblätter) von 20 *N. officinale*-Pflanzen vereint. Die ABA-Extraktion und Quantifizierung wurde im Zuge einer Kooperation an der Universität Amsterdam gemäß Floková *et al.* (2014) und Hayes *et al.* (2019) von Dr. Pulu Sun und Dr. Robert Schuurink durchgeführt.

2.7.12 Messung der ADH-Aktivität und Proteinbestimmung nach Bradford

Das Überflutungsexperiment erfolgte wie unter 2.6.1 beschrieben. Es wurde folgendes Pflanzenmaterial geerntet: für A. thaliana Col-O wurden alle Blätter ab Blatt # 6 geerntet, für C. hirsuta, C. pratensis, R. palustris und R. sylvestris alle Blätter ab Blatt # 5. Dabei wurden für jeden Zeitpunkt und Bedingung jeweils fünf Pflanzen vereint. Für jede Probe wurde das Frischgewicht nach Einfrieren in flüssigem Stickstoff bestimmt. Das gefrorene Pflanzenmaterial (ca. 100 mg) wurde fein pulverisiert, mit 500 µl Extraktionspuffer (50 mM 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)-KOH Puffer pH 6,8, 5 mM Mg-Acetat, 15 % (w/v) Glycerin, 1 mM Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure (EGTA), 1 mM Na₂-EDTA, 0,1 mM Pefabloc, 5 mM β -Mercaptoethanol) versetzt und für 15 min bei 4 °C und 16000g zentrifugiert. Zur Bestimmung der ADH-Aktivität wurden 10 μl des Überstandes mit 970 μl 50 mM TES-Puffer pH 7,5 sowie 10 μl 17 mM NADH (Endkonzentration 0,17 mM) versetzt. Die Absorptionsänderung wurde für 5 min bei 340 nm verfolgt. Nach der Zugabe von 10 μl 1 M Acetaldehyd (Endkonzentration 10 mM) als Substrat wurde die Absorptionsänderung erneut für 5 min bei 340 nm verfolgt. Die Proteinbestimmung erfolgte gemäß Bradford (1976). Dazu wurden 10 µl Proteinextrakt mit 1 ml Bradford-Reagenz (1:5 verdünnt, Roti-Quant, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe) vermischt und für 5 min inkubiert. Für eine Eichreihe wurde BSA (bovine serum albumin) mit einer Stammkonzentration von 1 mg/ml verwendet. Die Messung der Absorption erfolgte bei 595 nm. Die Berechnung der Enzymaktivität erfolgte aus der Differenz der Absorptionsänderungen pro Zeit und wurde auf die Proteinkonzentration der Probe bezogen.

2.7.13 SDS-PAGE und Western-Blot

Im Zuge einer diskontinuierlichen Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde zunächst ein SDS-Polyacrylamid-Gel hergestellt, welches aus einem 3 %-igem Sammel- und einem 10 %-igem Trenngel bestand (siehe Tab. 6). Die Probenvorbereitung erfolgte durch Zugabe von Harnstoffpuffer (5 % (w/v) SDS, 16,5 % (v/v) Glycerin, 4 M Harnstoff, Spatelspitze Bromphenolblau) im Verhältnis 1:1 zum Frischgewicht des pulverisierten Pflanzenmaterials. Die Proben wurden 10 min bei 95 °C gekocht und für 15 min bei 4 °C und 16000*g* zentrifugiert. Es wurde ein Probenvolumen von 40 µl und 5 µl des Proteinstandards PageRuler[™] Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe) auf das SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen. Die Auftrennung der Proteine erfolgte in einem Laufpuffer (25 mM TRIS, 192 mM Glycin und 0,1 % (v/v) SDS) bei einer Spannung von 85 V für 20 min und anschließender Spannung von 130 V, bis die Lauffront aus dem Gel diffundierte.

	Trenngel (Volumen)	Sammelgel (Volumen)
H ₂ O	2,4 ml	1,9 ml
Acrylamid/Methylenbisacrylamid (30 %/0,8 %)	2 ml	300 µl
1,5 M TRIS HCI (pH 8,8)	1,5 ml	-
0,5 M TRIS HCI (pH 6,8)	-	750 μl
10 % (w/v) SDS	60 µl	30 µl
11 % Ammoniumpersulfat	30 µl	15 µl
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin	10 µl	5 μl

Tab. 6 Zusammensetzung des SDS-Polyacrylamidgels für die SDS-PAGE. Dargestellt sind die Volumenangaben für je ein 10 %-iges Trenngel und ein 3 %-iges Sammelgel.

Sowohl die SDS-PAGE als auch der anschließende Western-Blot wurde mit einer Apparatur der Firma Bio-Rad (Feldkirchen) durchgeführt. Vor dem Proteintransfer wurde zunächst eine PVDF (Polyvinylidenfluorid)-Membran (Roti-PVDF, Porengröße 0,45 µm, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe) für 5 min in Methanol aktiviert und in Transferpuffer (25 mM TRIS, 192 mM Glycin und 20 % (v/v) Methanol) inkubiert. Der Transfer erfolgte in Transferpuffer unter Kühlung für 1 h bei 100 V. Nach dem Transfer wurde die Membran für 3 x 5 min in 1x PBS-T (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄, 0,1 % (v/v) Tween-20, pH 7,4) gewaschen und anschließend ÜN unter Rotierung bei 4 °C in Blockierlösung (2,5 % (w/v) Magermilchpulver in 1x PBS-T) inkubiert. Die Membran wurde nach dem Blockieren erneut für 3 x 5 min in 1x PBS-T gewaschen und anschließend für 1 h mit einer 1:3000-Verdünnung des monoklonalen Anti-Hämagglutinin (HA)-Antikörpers (H9658, Sigma-Aldrich, Taufkirchen) behandelt. Nach erneutem Waschen (3 x 5 min in 1x PBS-T) erfolgte eine Inkubation mit einer 1:10.000-Verdünnung des Anti-Maus-Meerrettichperoxidase (HRP)-Antikörpers (4759-1, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe) für 1 h. Die Membran wurde erneut 3 x 5 min in 1x PBS-T gewaschen und mit 500 µl Entwicklerlösung (Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent, RPN2236, GE Healthcare UK Limited, Little Chalfont, Buckinghamshire, Großbritannien) versetzt.

Die Lumineszenz wurde daraufhin mit einem Chemilumineszenz-Detektor (Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen) nach einer Belichtungszeit von 10 min detektiert. Zur Visualisierung der transferierten Proteine (RuBisCO als Ladekontrolle) wurde die Membran mit Coomassie-Brillant-Blau (CBB) gefärbt. Dazu wurde die Membran mit CBB-Lösung (0,1 % Coomassie Brillantblau R-250, 10 % (v/v) Essigsäure, 50 % (v/v) Methanol in H₂O) für 1-3 min unter Schwenken inkubiert. Die Entfärbung erfolgte in einer Waschlösung (7 % (v/v) Essigsäure, 20 % (v/v) Methanol in H₂O) für 4 min und anschließendem Spülen mit H₂O. Alternativ wurde zur Visualisierung der transferierten Proteine die PVDF-Membran mit Ponceau-Rot (0,1 % (w/v) Ponceau S in 5 % (v/v) Essigsäure) gefärbt und mit H₂O gewaschen.

2.8 Bioinformatische Auswertung der RNA-seq Daten

2.8.1 Referenztranskriptome

Das Trimmen der Adapter aus den FASTQ Dateien wurde von Dr. Alfons Weig (Genomanalytik & Bioinformatik, Universität Bayreuth) unter Verwendung des BBDuk-Algorithmus durchgeführt. Das *A. thaliana*-Referenztranskriptom wurde von araport.org und das *N. officinale*-Referenztranskriptom von Voutsina *et al.* (2016) bezogen. Die Referenztranskriptome für *C. hirsuta, C. pratensis, R. palustris* und *R. sylvestris* wurden durch Kooperation mit der Universität Utrecht von Dr. Hans van Veen erstellt. Dabei wurden die Referenztranskriptome für *C. pratensis, R. palustris* und *R. sylvestris* mittels Trinity *de novo assembly* (Grabherr *et al.,* 2011) und für *C. hirsuta* mittels Trinity *genome-guided de novo assembly* anhand des Referenzgenoms von Gan *et al.* (2016) erstellt. Die Anzahl der Transkripte nach erfolgtem *Assembly* können Tab. 7 (Start) entnommen werden.

2.8.2 Differenzielle Genanalyse, Gene Ontology-Analyse und Clustering

Die Quantifizierung der erhaltenen Fragmente (Reads) gegen das Referenztranskriptom wurde von Dr. Hans van Veen (Universität Utrecht, Niederlande) unter Verwendung von Kallisto (Bray *et al.*, 2016) durchgeführt. Sequenzähnlichkeiten zum *A. thaliana* Col-O-Transkriptom wurden mittels Nukleotid-BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*, BLASTN) berechnet. Für *C. pratensis*, *R. palustris* und *R. sylvestris* wurden nur Transkripte selektiert, die mindestens 40 % Sequenzidentität mit *A. thaliana*-Transkripten aufwiesen. Transkripte, die eine hohe Sequenzähnlichkeit (BLASTN E-Value=0) mit dem homologen *A. thaliana*-Transkript aufwiesen, wurden zusammengefügt und die Reads summiert. Niedrig exprimierte Transkripte wurden basierend auf einem Schwellenwert gefiltert (siehe Tab. 7). Dieser Schwellenwert wurde auf die Summe der tpm (*transcript per million*) aller Bibliotheken pro Spezies angewendet und betrug 3 bei insgesamt 12 Bibliotheken und 6 bei insgesamt 24 Bibliotheken.

Die differenzielle Genexpressionsanalyse wurde für jede Art separat mit den Bioconductor Paketen *edgeR* und *limma* (McCarthy *et al.*, 2012) in RStudio (Version 1.0.153, RStudio Inc., Boston, MA, USA) durchgeführt. Dabei wurden die *log₂ fold changes* (log₂FC) und Benjamini-Hochberg-korrigierten *P*-Werte (*P_{adj}*) anhand eines *negative binomial generalized log-linear models* mit einer vollfaktoriellen Designmatrix von Gewebe und Behandlung berechnet. Um die differenziell exprimierten Gene (DEGs) von *A. thaliana, C. hirsuta, C. pratensis, R. palustris* und *R. sylvestris* direkt miteinander vergleichen zu können, wurden die DEGs basierend auf den *Arabidopsis Genome Initiative* (AGI)-Gencodes in einer Datei vereint. Dazu wurden die DEGs zunächst anhand des niedrigsten BLASTN E-Values selektiert. Doppelt vorkommende DEGs wurden anschließend anhand des niedrigsten *P_{adj}* nach 1 d Überflutung gefiltert. Die multidimensionale Skalierung wurde durch die *plotMDS*-Funktion im *edgeR*-Paket in RStudio erstellt.

Tab. 7 Übersicht zur Selektion von RNA-seq Transkripten für die differenzielle Genanalyse. Die Selektion erfolgte ausgehend von der Anzahl der Transkripte, die der Quantifizierung mittels Kallisto unterzogen wurden (Start). Es wurden folgende Schritte durchgeführt: 1. Auswahl von Transkripten mit einer $\ge 40\%$ Sequenzähnlichkeit zu *A. thaliana* (nur bei *C. pratensis, R. palustris* und *R. sylvestris*), 2. Summieren der Transkripte mit E-Value = 0 zu *A. thaliana* und 3. Filtern von schwach exprimierten Transkripten basierend auf einem Schwellenwert (*threshold*, th), angewendet auf die Summe der tpm (*transcript per million*) aller Bibliotheken pro Spezies. Gezeigt sind jeweils die Anzahl der Transkripte, die nach jedem Schritt erhalten wurden, NA: nicht angewendet.

			Selektionsschritte			
	Anzahl der Proben	Start	1. Auswahl	2. Summieren	3. Filtern	
A. thaliana	12	48.359	NA	NA	31.795 (th ≥ 3)	
C. hirsuta	12	47.187	NA	40.151	37.668 (th ≥ 3)	
C. pratensis	12	231.047	91.354	48.387	42.212 (th ≥ 3)	
N. officinale	24	80.741	NA	63.466	41.880 (th ≥ 6)	
R. palustris	12	181.825	84.780	40.333	35.573 (th ≥ 3)	
R. sylvestris	12	196.726	88.887	43.138	38.245 (th ≥ 3)	

Die Gene Ontology (GO)-Analyse wurde mittels goseq Bioconductor-Paket (Young et al., 2010) in RStudio durchgeführt. Für A. thaliana, C. hirsuta, C. pratensis, R. palustris und R. sylvestris wurde die GO-Analyse auf alle DEGs mit einem BLASTN E-Value < 10^{-6} angewandt. Für N. officinale wurden die CPM (counts per million) Werte von allen Transkripten skaliert und normalisiert. Hochsignifikante (P_{adj} < 0,001) DEGs wurden mit fuzzy K-means-Clustering zusammengefügt, basierend auf euclidean distances und membership exponent von 1,2 (Rlibrary cluster). Das Clustering der N. officinale DEGs wurde von Dr. Hans van Veen (Universität Utrecht, Niederlande) durchgeführt.

2.9 Verwendete Webtools

Sequenzalignments und der phylogenetische Stammbaum wurden mit *Multiple Sequence Alignment by CLUSTALW* (https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw) und Proteinsequenzen mit dem *ExPASy translate tool* (https://web.expasy.org/translate/) generiert.

2.10 Statistische Auswertung

Ein- und zweifaktorielle Varianzanalysen (ANOVA) mit Tukey's HSD (*honestly significant difference*) Test wurden mit RStudio durchgeführt. Zweifaktorielle ANOVA mit Sidak Test sowie Student's *t* test wurden mit Prism 8 (GraphPad Software, San Diego, USA) durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1 Charakterisierung der Überflutungsreaktionen von Pflanzen der Brassicaceae-Familie

3.1.1 Überflutung führt zu artenspezifischen Wachstumsreaktionen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Überflutungsreaktionen der Brassicaceae-Wildpflanzen *Cardamine hirsuta, Cardamine pratensis, Nasturtium officinale, Rorippa palustris* und *Rorippa sylvestris* untersucht. Diese Wildpflanzen besaßen das Potenzial, sich als neue Modellpflanze für Überflutungstoleranz zu etablieren, da sie häufig in Feuchtgebieten vorkommen und eng mit der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* verwandt sind (Abb. 6a). Zunächst wurde das Wachstum der Pflanzen unter Kurztagbedingungen beobachtet, um einen geeigneten Zeitpunkt in der vegetativen Wachstumsphase definieren zu können, der einen gleichwertigen Vergleich zwischen den Arten ermöglichte. Dabei konnte auch bestätigt werden, dass Vertreter von *Cardamine* und *Rorippa* rosettenartig wachsen, während *N. officinale* die einzige hier untersuchte nicht-rosettenartige Pflanzenart ist (Abb. 6b).



Abb. 6 Phylogenetische und phänotypische Charakterisierung der ausgewählten Brassicaceae-Wildpflanzen. (a) Phylogenetischer Stammbaum basierend auf einem ClustalW multiplen Sequenzalignment der *ITS1* (*internal transcribed spacer 1*) Gensequenz (NCBI Genbank) von ausgewählten Spezies innerhalb der Brassicaceae-Familie. (b) Repräsentative Fotos von ca. 3-4 Wochen-alten Pflanzen. Die Anzahl der Blätter betrug bei *A. thaliana* 10 und bei den anderen Arten 6 (Keimblätter wurden nicht mitgezählt). Skala entspricht 1 cm.

Bei *A. thaliana, C. hirsuta* und *R. palustris* konnte ein homogenes Wachstum zwischen den Individuen festgestellt werden. Individuen von *R. sylvestris* und insbesondere von *C. pratensis* unterschieden sich teilweise sehr stark hinsichtlich Größe und Anzahl der Blätter. Bei *R. sylvestris* lag das an der vegetativen Vermehrung, da die neuen Individuen an unterschiedlichen Zeitpunkten austrieben. Das ungleichmäßige Wachstum bei *C. pratensis* könnte auf eine unterschiedliche Chromosomenanzahl der Individuen zurückzuführen sein. Bei einer Chromosomenanalyse von *C. pratensis*-Individuen konnten sowohl 14 (2n= 28) als auch 15 (2n= 30) Chromosomenpaare nachgewiesen werden (Dr. Ulrich Meve, Lehrstuhl Pflanzensystematik, Universität Bayreuth; Daten nicht gezeigt). Aufgrund der unterschiedlichen Wachstumsgeschwindigkeiten wurde für die folgenden Experimente ein spezifisches Blattstadium ausgewählt, bei dem alle Arten von vergleichbarer Größe waren, weshalb für *A. thaliana* das 10-Blattstadium und für die Wildpflanzen das 6-Blattstadium verwendet wurde (Abb. 6b).

Pflanzen nutzen zwei verschiedene Strategien, um Überflutung zu überleben: die Quiescence-Strategie oder die Escape-Strategie (Bailey-Serres & Voesenek, 2008). Bei Pflanzenarten mit einer Quiescence-Strategie ist ein eingeschränktes Wachstum und bei Pflanzenarten mit einer Escape-Strategie ein verstärktes Wachstum in Reaktion auf Überflutung zu erwarten. Um herauszufinden, welche Strategie die Brassicaceae-Wildpflanzen verwenden, wurden diese unter Kurztagbedingungen überflutet und nach 1 d, 2 d und 3 d das Wachstum von Kontroll- und Überflutungspflanzen verglichen (Abb. 7). Dazu wurde die Länge des jüngsten Blattes von allen rosettenartig wachsenden Pflanzen und die Länge von Stängel und Petiole des jüngsten Blattes von N. officinale-Pflanzen gemessen. Zusätzlich erfolgte eine Messung vor Beginn des Experiments, wodurch das jeweilige Wachstum als Differenz bis zu einem bestimmten Zeitpunkt ermittelt werden konnte (Abb. 7). Die Blätter von A. thaliana (Abb. 7a), C. hirsuta (Abb. 7b), R. palustris (Abb. 7d) und R. sylvestris (Abb. 7e) zeigten ein signifikant geringeres Wachstum bei Überflutung im Vergleich zu Kontrollbedingungen. Bei A. thaliana und R. palustris konnte dieser signifikante Unterschied zwischen überfluteten Pflanzen und Kontrollpflanzen bereits nach 1 d und bei C. hirsuta und R. sylvestris nach 2 d nachgewiesen werden. Interessanterweise zeigten sowohl A. thaliana als auch R. palustris eine hyponastische Bewegung der Blätter in Reaktion auf Überflutung (Abb. 8). Da dies jedoch nicht mit einer Elongation der Blätter einherging, wurde die Reaktion nicht näher untersucht. N. officinale zeigte bereits nach 1 d ein verstärktes Stängelwachstum in Reaktion auf Überflutung, während das Wachstum in der Petiole des jüngsten Blattes stark eingeschränkt wurde (Abb. 7f, g). Bei C. pratensis konnten nach 3 d keine Unterschiede zwischen Kontrollund Überflutungspflanzen festgestellt werden (Abb. 7c). Nachdem die Überflutungsdauer auf 7 d erhöht wurde, zeigten die beiden jüngsten Blätter ein reduziertes Wachstum bei Überflutung, wenngleich der Unterschied zwischen Kontroll- und Überflutungspflanzen weiterhin nicht signifikant war (Abb. A1a).

36



Abb. 7 Überflutung führt zu einem eingeschränkten Wachstum in den Blättern der Rosettenpflanzen sowie zu einem verstärkten Wachstum in den Stängeln und einem reduzierten Wachstum in den Petiolen von *N. officinale*. Pflanzen des 6-Blattstadiums (*C. hirsuta, C. pratensis, N. officinale, R. palustris, R. sylvestris*) oder 10-Blattstadiums (*A. thaliana*) wurden unter Kurztagbedingungen überflutet (schwarz), als Kontrolle (weiß) dienten Pflanzen, die unter Kurztagbedingungen normal bewässert wurden. Zu Beginn des Experiments und nach 1 d, 2 d und 3 d wurde die Länge des jüngsten Blattes (a-e) bzw. die Länge des Stängels und die Länge der Petiole des jüngsten Blattes (f-g) gemessen. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM mit n= 15 aus drei biologischen Replikaten (a)-(e) und Mittelwerte \pm SEM mit n= 34 aus 5 unabhängigen Experimenten (f)-(g). Signifikante Unterschiede zwischen Kontrolle und Überflutung sind gekennzeichnet durch ***, *P* < 0,001, ns = nicht signifikant (zweifaktorielle ANOVA mit *P* < 0,05, Sidak Test).



Abb. 8 Die Blätter von A. thaliana und R. palustris zeigen eine hyponastische Bewegung in Reaktion auf Überflutung. Repräsentative Bilder einer Kontrollpflanze (links) und einer überfluteten Pflanze (rechts). Die Dokumentation erfolgte etwa 2 h nach Überflutung. Die überflutete Pflanze war während der Dokumentation noch unter Wasser. Skala entspricht 1 cm.

Somit zeigten alle Rosettenpflanzen bei Überflutung eine *Quiescence*-Strategie, während *N. officinale* die einzige Spezies war, die eine *Escape*-Strategie annahm. Bisher wurde *R. amphibia* als einzige elongierende Pflanzenart in der Brassicaceae-Familie beschrieben (Stift *et al.*, 2008; Akman *et al.*, 2012). Dies konnte jedoch zumindest im Hinblick auf das Wachstum der beiden jüngsten Blätter nicht bestätigt werden (Abb. A1b). Vielmehr beschränkt sich das überflutungsinduzierte Wachstum auf den Blütenstängel (Stift *et al.*, 2008; Akman *et al.*, 2012), was im Zuge dieser Arbeit jedoch nicht näher betrachtet wurde, da lediglich die Reaktionen der Pflanzen im vegetativen Stadium verglichen wurden.

3.1.2 Überlebensexperiment offenbart Unterschiede in der Überflutungstoleranz

Voraussetzung zur Identifizierung von Mechanismen der Überflutungstoleranz ist das Überleben bei langanhaltender Überflutung. Um die untersuchten Pflanzenarten anhand ihrer Überflutungstoleranz einordnen zu können, wurden diese unter Kurztagbedingungen bis zu 10 Wochen überflutet. Ein längerer Zeitraum war aufgrund des starken Algenwachstums nicht realisierbar. Nach den angegebenen Zeitpunkten wurden je 8 Individuen aus der Überflutungsbox entnommen (Abb. A3) und das Überleben nach 2 Wochen Regeneration unter Kurztagbedingungen ermittelt (Abb. 9). Das Überleben der Pflanzen wurde definiert als das Überleben des Blattmeristems und die damit verbundene Fähigkeit, neue Blätter zu bilden. Da *N. officinale* schon nach wenigen Wochen durch verstärktes Stängelwachstum die Wasseroberfläche erreichte und die Pflanzen somit Zugang zur sauerstoffreichen Luft hatten (Abb. A2), wurde lediglich die Überflutungstoleranz der rosettenartig wachsenden Wildpflanzen und der Modellpflanze *A. thaliana* miteinander verglichen.

Es konnte ein deutlicher Unterschied zwischen *A. thaliana* und den Wildpflanzen festgestellt werden. Nach 3,5 Wochen Überflutung überlebten nur 25 % der *A. thaliana*-Individuen (Abb. 9a), während die Individuen der Wildpflanzen auch nach 4 Wochen Überflutung noch vollständig überlebten (Abb. 9be). Doch auch innerhalb der Wildpflanzen konnten Unterschiede beobachtet werden. Bei *C. hirsuta* überlebten nach 8 Wochen Überflutung lediglich 25 % der Individuen, welche nach der Regenerationsphase zudem nur kleine Blätter ausbildeten (Abb. 9b). Nach 10 Wochen Überflutung konnte bei *C. pratensis, R. palustris* und *R. sylvestris* weiterhin eine Überlebensrate von 100 % verzeichnet werden (Abb. 9c-e). Direkt nach der Überflutung besaßen alle Individuen der Wildpflanzen noch grüne Blätter (Abb. A3b-e), während bei *A. thaliana* (Abb. A3a) bereits 2 Individuen tot waren. Im direkten Vergleich konnten somit *A. thaliana* und *C. hirsuta* als überflutungssensitiv und *C. pratensis, R. palustris* sowie *R. sylvestris* als überflutungstolerant eingeordnet werden. Insbesondere bei *R. palustris* (Abb. 9d) und *R. sylvestris* (Abb. 9e) zeigten alle überlebenden Pflanzen ein starkes Wachstum in der Regenerationsphase. Deshalb wurden die beiden *Rorippa*-Arten zudem als extrem tolerant eingestuft.



Abb. 9 Die rosettenartigen Pflanzen weisen Unterschiede in der Überflutungstoleranz auf. (a)-(e): Überlebensrate [%] von jeweils 8 Individuen pro Zeitpunkt in einem Experiment. Die Pflanzen wurden für den angegebenen Zeitraum [w, Wochen] überflutet. Nach etwa 2 Wochen Regenerationszeit wurde das Überleben des Sprossmeristems durch die Bildung neuer Blätter bestimmt. Die Bilder zeigen den letzten Zeitpunkt, bei dem mindestens 25 % der Pflanzen überlebten. Skala entspricht 2 cm. Eine Übersicht der Pflanzen direkt nach der Überflutung ist in Abb. A3 dargestellt.

3.2 Identifizierung molekularer Mechanismen bei Überflutung mittels RNA-seq

Es konnte gezeigt werden, dass die einzige nicht-rosettenartig wachsende Pflanze auf Überflutung mit einem verstärkten Stängelwachstum und einer Wachstumshemmung in der Petiole reagierte. Diese Beobachtung bot die einzigartige Möglichkeit, *N. officinale* als Modellsystem zu verwenden, um kontrastierende Wachstumsstrategien innerhalb einer einzelnen Pflanze zu untersuchen. Zudem zeigten alle rosettenartigen Pflanzen eine *Quiescence*-Strategie, wiesen jedoch deutliche Unterschiede in der Überflutungstoleranz auf.

Anhand der bisherigen Ergebnisse ergaben sich daher zwei Fragestellungen, die in den folgenden Kapiteln näher betrachtet werden:

1. Wie werden die gegensätzlichen Wachstumsstrategien in N. officinale reguliert?

2. Welche Mechanismen tragen zur Überflutungstoleranz innerhalb der Quiescence-Strategie bei?

Um die molekularen Regulatoren von Wachstum und Toleranz bei Überflutung identifizieren zu können, wurde ein RNA-seq Experiment durchgeführt. Aufgrund der größten Unterschiede im Strategieexperiment (siehe Abb. 7) wurden die Zeitpunkte 1 d und 2 d ausgewählt. Die Sequenzierung der cDNA-Bibliotheken erfolgte mittels Illumina (100 bp im *paired end*-Modus) und ergab durchschnittlich 39 Mio. Reads für *A. thaliana, C. hirsuta* und *C. pratensis,* 35 Mio. Reads für *N. officinale,* 37 Mio. Reads für *R. palustris* und 36 Mio. Reads für *R. sylvestris*. Die durchschnittlichen Mappingraten der RNA-seq Reads gegen das jeweilige Referenztranskriptom waren wie folgt: 79 % für *A. thaliana,* 86 % für *C. hirsuta,* 69 % für *C. pratensis,* 85 % für *N. officinale,* 76 % für *R. palustris* und 74 % für *R. sylvestris*. Die Anzahl der Reads und die Mappingrate jeder einzelnen cDNA-Bibliothek können Tab. A2 bis Tab. A7 entnommen werden.

Durch die BLASTN-Analyse konnten oft mehrere Transkripte von *C. hirsuta, C. pratensis, N. officinale, R. palustris* und *R. sylvestris* einem homologen *A. thaliana*-Gen zugeordnet werden. Zur Vereinfachung werden deshalb im weiteren Verlauf die AGI-Gencodes von *A. thaliana* verwendet, um die homologen *Cardamine-, Nasturtium-* und *Rorippa*-Transkripte zu beschreiben. Sämtliche Transkript-IDs können dem Anhang (Daten A1, Daten A2) entnommen werden. Um einen Informationsverlust zu verhindern, wird außerdem im Folgenden die Beschreibung der Gene und GO-Kategorien in englischer Sprache beibehalten.

3.3 Kontrastierende Wachstumsstrategien in N. officinale bei Überflutung

3.3.1 Überflutung führt zu gewebespezifischen und gewebeunspezifischen Reaktionen Wie bereits in Abb. 7 beschrieben, reagierte *N. officinale* auf Überflutung mit einem verstärkten Stängelwachstum und einem eingeschränkten Wachstum in der Petiole des jüngsten Blattes (Abb. 10a, b). Überflutung beschleunigte außerdem die Blattseneszenz und verzögerte die Blattbildung im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 10c). Interessanterweise wurde das Wachstum nicht nur in der Petiole des jüngsten Blattes, sondern auch in den Petiolen des zweit- und drittjüngsten Blattes (Abb. 10d) signifikant eingeschränkt.



Abb. 10 Überflutung führt zu verstärktem Stängelwachstum und eingeschränktem Wachstum in Petiolen von *N. officinale.* (a) Repräsentative Bilder einer Kontroll- (links) und Überflutungspflanze (rechts) nach 5 d Behandlung. Zur Dokumentation wurde die Kontrollpflanze vertikal fixiert und die Überflutungspflanze war noch unter Wasser. (b) Dargestellt ist das Wachstum von Stängel (hell- bzw. dunkelblau) und Petiole des jüngsten Blattes (hell- bzw. dunkelgrün). Die gezeigten Daten stimmen mit den Daten aus Abb. 7 f, g überein. (c) Überflutung beschleunigt die Blattseneszenz und verlangsamt die Blattbildung. Repräsentative Bilder einer präparierten Kontroll- (oben) und einer Überflutungspflanze (unten). Dargestellt sind (von links nach rechts) Kotyledonen und Hypokotyl, Blätter sortiert von alt nach jung und Stängel (unten). (d) Wachstum der Petiolen des jüngsten bis drittjüngsten Blattes nach 1 d, 3 d und 7 d Überflutung (dunkelgrün) oder unter Kontrollbedingungen (hellgrün). Dargestellt ist der Mittelwert ± SEM mit n= 5 aus einem Experiment. Unterschiedliche Buchstaben repräsentieren signifikante Unterschiede mit P < 0,05 (einfaktorielle ANOVA mit Tukey's HSD Test, separat getestet für jede Petiole). (a)+(c) Skala entspricht 1 cm.

Wachstum ist ein energieaufwendiger Prozess und eine geringe Verfügbarkeit oder Verwertbarkeit der Zucker könnte das Wachstum einschränken. Tatsächlich konnte durch Zugabe von Saccharose zum Überflutungswasser das Wachstum in beiden Geweben signifikant erhöht werden, was Zucker als limitierenden Faktor des Unterwasser-Wachstums bestätigt (Abb. A4). Um herauszufinden, ob die gewebespezifischen Wachstumsreaktionen auf Unterschiede in der Kohlenhydratverfügbarkeit zurückzuführen sind, wurden die Zucker- und Stärkegehalte von Petiolen und Stängeln zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmt (Abb. 11).



Abb. 11 Überflutung induziert den Abbau von Kohlenhydraten in beiden Geweben. Zu Beginn des Experiments (0 h) und zu den angegebenen Zeitpunkten [in h] wurden Stängel (a) und Petiolen (b) von fünf Pflanzen geerntet und die Zucker- und Stärkegehalte enzymatisch gemessen. Glucose (Glc)-, Fructose-, Saccharose- und Stärkegehalte sind als Glc-Äquivalente pro g FW gezeigt. Dargestellt ist der Mittelwert ± SEM mit n= 3 aus drei biologischen Replikaten (Daten wurden durch Malte Bartylla erhoben). Unterschiedliche Buchstaben repräsentieren signifikante Unterschiede mit P < 0,05 (zweifaktorielle ANOVA mit Tukey's HSD Test, getestet für die Summe aus allen Zuckern je Probe, separat für (a) und (b)).

Wie erwartet nahmen Zucker- und Stärkegehalte in Kontrollpflanzen mit der Beleuchtungsdauer zu und in der Nacht ab. Beide Gewebe verbrauchten bereits innerhalb der ersten 3 h nach Überflutung mehr als 50 % ihrer gespeicherten Kohlenhydrate. Obwohl die anfänglichen Zuckergehalte von Stängeln (Abb. 11a; 3,3 µmol Glucoseäquivalente pro g FW) im Vergleich zu Petiolen (Abb. 11b; 2,1 µmol pro g FW) höher waren, gab es an keinem der getesteten Zeitpunkte signifikante Unterschiede zwischen den Geweben. Dies deutet auf eine ähnliche Verfügbarkeit von Kohlenhydraten in beiden Geweben und auf keine Korrelation mit den kontrastierenden Wachstumsreaktionen hin. Nach 24 h Überflutung fiel der Zuckergehalt auf 20 % des Ausgangsniveaus, was auf einen Zuckermangel in beiden Geweben hinweist.

3.3.2 Überflutung verursacht erhebliche Veränderungen des Transkriptoms

Um die molekularen Mechanismen der gegensätzlichen Wachstumsreaktionen aufklären zu können, wurde ein RNA-seq-Experiment an Stängeln und Petiolen nach 1 d und 2 d Überflutung durchgeführt. Die Anzahl der differenziell exprimierten Gene (DEGs; P_{adj} <0,05, log2FC > 1 / log2FC < -1) war zu beiden Zeitpunkten in den Petiolen höher als in den Stängeln (Abb. 12a). In den Petiolen wurden nach 1 d bzw. 2 d Überflutung 3910 bzw. 4428 Transkripte induziert und 2921 bzw. 4981 Transkripte reprimiert. Im Vergleich dazu wurden in den Stängeln nach 1 d bzw. 2 d Überflutung 2854 bzw. 2796 Transkripte induziert und 2545 bzw. 2919 Transkripte reprimiert. Eine multidimensionale Skalierung der Transkripte zeigte eine klare Trennung von Gewebe und Behandlung, jedoch keinen Unterschied in den biologischen Replikaten oder den Zeitpunkten (Abb. 12b). Zusätzlich wurden in beiden Geweben zu beiden Zeitpunkten mehr als 1000 Transkripte gemeinsam induziert oder herunterreguliert (Abb. 12c, d), was eine Induktion und Repression von Überflutungskerntranskripten repräsentiert.



Abb. 12 Übersicht der differenziell exprimierten Gene in Petiolen und Stängeln von *N. officinale* bei Überflutung. (a) Die Anzahl an differenziell exprimierten Genen (DEGs) ist in Petiolen höher als in Stängeln. Gelb repräsentiert induzierte und Cyan reprimierte DEGs. (b) Multidimensionale Skalierung (MDS) zeigt eine Auftrennung nach Gewebe und Behandlung. Der Abstand zwischen den Proben wurde auf der Grundlage der top 4000 paarweise kontrastierenden Genen berechnet. Venn-Diagramme repräsentieren die Überschneidung von induzierten (c) und reprimierten (d) Genen bei Überflutung. DEGs wurden anhand folgender Kriterien ausgewählt: $log_2FC > 1$ bzw. $log_2FC < -1$ und $P_{adj} < 0,05$.

Um gewebespezifische und gewebeunspezifische molekulare Mediatoren bei Überflutung identifizieren zu können, wurden sämtliche Gene gruppiert, die bei Überflutung in mindestens einem der beiden Gewebe zu einem Zeitpunkt höchst signifikant differenziell exprimiert wurden (P_{adj} < 0,001; Abb. 13). Die resultierenden 6 Gencluster von ähnlich regulierten Genen wurden anschließend einer GO-Analyse unterzogen (Tab. 8, Anhang Daten A3).



Abb. 13 Genclustering zeigt die gewebespezifischen und gewebeunspezifischen Reaktionen auf Überflutung. Geigenplots visualisieren das *fuzzy K-means-Clustering* von ähnlich regulierten Transkripten. Die x-Achse zeigt die verschiedenen Proben und die y-Achse die skalierten und normalisierten CPM (*counts per million*)-Werte von höchst signifikanten ($P_{adj} < 0,001$) differenziell exprimierten Genen. Die Cluster 3 und 4 repräsentieren die gewebeunspezifisch regulierten Transkripte und Cluster 1, 2, 5 und 6 die gewebespezifisch regulierten Transkripte. Die Breite jeder Geige entspricht der Anzahl von Transkripten bei diesem Expressionslevel; K= Kontrolle, Ü= Überflutung.

Tab. 8 *Gene Ontology* **(GO)-Analyse der gewebespezifischen und gewebeunspezifischen Gencluster.** Dargestellt ist das Ergebnis der GO-Analyse der in Abb. 13. dargestellten Gencluster. Gezeigt sind nur ausgewählte Beispiele der am stärksten angereicherten (basierend auf dem *P*-Wert) GO-Kategorien für biologischer Prozess, molekulare Funktion und Zellkompartiment. Eine vollständige Übersicht ist im Anhang (Daten A3) zu finden.

Cluster	Biologischer Prozess	Molekulare Funktion	Zellkompartiment
1	defense response, circadian		chloroplast
	rhythm, photosynthesis		
2	amino acid homeostasis,	peroxidase activity, efflux	casparian strip, plasma
	glucuronoxylan metabolic	transmembrane transporter activity,	membrane, lytic vacuole,
	process, xylan biosynthetic	water channel activity	extracellular region
	process		
3	response to wounding,	hydrolase activity,	plasma membrane,
	response to brassinosteroid,	protein heterodimerization activity,	extracellular region,
	response to auxin	dehydrogenase activity	cytoplasmic microtubule
4	biosynthetic process,	hydrolase, carbohydrate phosphatase	plasma membrane,
	metabolic process	and phosphoenolpyruvate carboxylase	extracellular region,
		activity	cytoplasmic microtubule
5	response to light,	chlorophyll binding, ribulose-	chloroplast
	photosynthesis,	bisphosphate carboxylase activity	
	rRNA processing		
6	translation, DNA replication,	structural constituent of ribosome,	ribosome, nucleolus,
	gene silencing,	translation elongation factor activity,	cell wall
	cell proliferation	histone binding	

Die 1809 Transkripte von Cluster 3, die in beiden Geweben stark induziert wurden, umfassten O₂- und Kohlenhydratmangel-assoziierte Gene, beispielsweise die *N. officinale* homologen Gene für *BRANCHED-CHAIN AMINO ACID TRANSAMINASE 2* (*BCAT-2, AT1G10070*), *MYO-INOSITOL OXYGENASE 2* (*MIOX2, AT2G19800*), *PHOSPHOENOLPYRUVATE CARBOXYKINASE 2* (*PEPCK, AT5G65690*), *PYRUVATE ORTHOPHOSPHATE DIKINASE* (*PPDK, AT4G15530*), aber auch Transkriptionsfaktoren (*AT1G68320, AT2G43140*) und Defensine (*AT3G63360, AT5G33355*). Die GO-Analyse dieser stark induzierten Gene ergab eine Anreicherung der GO-Kategorien "response to wounding", "response to brassinosteroid" und "response to auxin" (Tab. 8).

Unter den 1351 Genen in Cluster 4, die in beiden Geweben stark reprimiert wurden, befanden sich metabolische Gene wie PHOSPHATE STARVATION-INDUCED GENE 2 (PS2, AT1G73010), GLYCEROL-3-PHOSPHATE SN-2-ACYLTRANSFERASE 2 (GPAT2, AT1G02390), ISOPROPYLMALATE DEHYDROGENASE 1 (IMD1, AT5G14200), ISOPROPYLMALATE ISOMARASE 1, 2 (IPMI1/2; AT3G58990, AT2G43100) und BRANCHED-CHAIN AMINOTRANSFERASE 4 (BCAT-4, AT3G19710). Die starke GO-Anreicherung von

Biosynthese- und Stoffwechselprozessen in Cluster 4 (Tab. 8) unterstützt die Bedeutung der Herunterregulierung energieaufwendiger Prozesse in beiden Geweben während der Überflutung.

Interessanterweise wurde kein Gencluster identifiziert, das Gene enthielt, welche in einem Gewebe hochreguliert und in dem anderen Gewebe herunterreguliert waren. Tatsächlich wurden nur die Gene ATP-BINDING CASSETTE B14 (ABCB14, AT1G28010) und NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein (AT5G02540) eindeutig in den Petiolen induziert und in den Stängeln reprimiert, während kein eindeutiges Stängel-spezifisches Gen gefunden wurde. Dennoch wurden gewebespezifische Unterschiede im Expressionsniveau bei Überflutung identifiziert. Cluster 1 repräsentiert 748 Gene mit einer höheren Gesamtexpression und Induktion in den Petiolen. Diese Gene enthielten Homologe für HEAT SHOCK TRANSCRIPTION FACTOR A4A (HSFA4A, AT4G18880) und protein kinase superfamily proteins (AT1G56720, AT1G03740, AT1G74330). Unter den überrepräsentierten GO-Kategorien befanden sich Abwehrreaktions- und Photosynthesevorgänge (Tab. 8). Gene mit einer höheren Expression und Induktion in den Stängeln wurden dem Cluster 2 (423 Gene) zugeordnet und mit den GO-Kategorien "amino acid homeostasis", "glucuronoxylan metabolic process" und "xylan biosynthetic process" (Tab. 8) in Verbindung gebracht, was auf eine strukturelle Umlagerung der Zellwand während der Elongation hindeutet. Gene, die für zellwandlockernde Enzyme wie EXPs, XTHs und PMEs codieren, wurden nach 1 d und 2 d Überflutung jedoch in beiden Geweben auf ähnliche Weise exprimiert (Abb. 14).

Cluster 5 (518 Gene) repräsentiert Gene mit einem niedrigeren Expressionsniveau in den Stängeln im Vergleich zu den Petiolen. Die entsprechenden GO-Kategorien umfassten "response to light", "photosynthesis" und "rRNA processing" (Tab. 8). Gene mit einer stärkeren Herunterregulierung in Petiolen wurden Cluster 6 (1643 Gene) zugeordnet. Zu diesen Genen gehörten z. B. *CELL DIVISION CONTROL 6 (CDC6, AT2G29680)* und *WUSCHEL RELATED HOMEOBOX 4 (WOX4, AT1G46480)*. Die GO-Anreicherungsanalyse von Cluster 6 ergab eine Reihe von Prozessen, die an der Translation, DNA-Replikation und Zellproliferation beteiligt sind (Tab. 8). Tatsächlich wurden Gene, die mit dem Zellzyklus (Abb. 15) und der DNA-Replikation (Abb. 16) assoziiert sind, in den Petiolen bedeutend stärker reprimiert als in den Stängeln. Darüber hinaus wurde *KIP-RELATED PROTEIN 1 (ICK1, AT2G23430)*, ein Zellzyklusinhibitor (Wang *et al.*, 2000), nach 2 d Überflutung signifikant in den Petiolen induziert (Abb. 15), was einen Stillstand des Zellzyklus während der Überflutung zur Folge haben könnte.

(a))							(b)						
	Peti	iole	Stär	nael					Peti	ole	Stär	nael			
- 1	1d	2d	1d	2d	Nasturtium-ID	AGI	Annotation		1d	2d	1d	2d	Nasturtium-ID	AGI	Annotation
	Х		Х		GEMC01037119.1	AT1G69530	EXPA1			Х		Х	GEMC01030958.1	AT2G06850	XTH4
				х	GEMC01037120.1	AT1G69530	EXPA1		Х	Х		Х	GEMC01011985.1	AT5G65730	XTH6
			Х		GEMC01032892.1	AT2G37640	EXP3		х	х		Х	GEMC01011986.1	AT5G65730	XTH6
			х		GEMC01032893.1	AT2G37640	EXP3						GEMC01014965.1	AT4G37800	XTH7
					GEMC01037121.1	AT2G39700	EXPA4					Х	GEMC01036801.1	AT4G03210	XTH9
					GEMC01037587.1	AT3G29030	EXPA5				х	х	GEMC01013987.1	AT2G14620	XTH10
			Х	Х	GEMC01037588.1	AT3G29030	EXPA5						GEMC01019967.1	AT3G48580	XTH11
	Х			Х	GEMC01037589.1	AT3G29030	EXPA5						GEMC01008268.1	AT4G14130	XTH15
					GEMC01009110.1	AT2G28950	EXPA6						GEMC01008269.1	AT4G14130	XTH15
					GEMC01026937.1	AT2G28950	EXPA6						GEMC01048492.1	AT3G23730	XTH16
	Х		Х	Х	GEMC01032900.1	AT2G40610	EXPA8				Х	Х	GEMC01048496.1	AT1G65310	XTH17
	Х		Х	Х	GEMC01032901.1	AT2G40610	EXPA8						GEMC01048490.1	AT4G30280	XTH18
	Х	х		Х	GEMC01032435.1	AT5G02260	EXPA9			Х		Х	GEMC01048494.1	AT4G30280	XTH18
					GEMC01020916.1	AT1G26770	EXPA10			х	Х		GEMC01048491.1	AT4G30290	XTH19
					GEMC01020917.1	AT1G26770	EXPA10		Х				GEMC01048497.1	AT4G30290	XTH19
	X			X	GEMC01020919.1	AT1G26770	EXPA10					Х	GEMC01017904.1	AT5G57560	TCH4
					GEMC01035201.1	AT1G20190	EXPA11			х		Х	GEMC01017905.1	AT5G57560	TCH4
					GEMC01034556.1	AT3G15370	EXPA12					Х	GEMC01013565.1	AT4G25810	XTR6
		Х	Х	Х	GEMC01079860.1	AT3G15370	EXPA12						GEMC01042312.1	AT4G30270	XTH24
					GEMC01037222.1	AT3G03220	EXPA13						GEMC01042314.1	AT4G30270	XTH24
	Х	Х	Х		GEMC01058003.1	AT5G56320	EXPA14						GEMC01047147.1	AT2G01850	EXGT-A3
					GEMC01038922.1	AT2G03090	EXPA15						GEMC01043709.1	AT1G14720	XTH28
					GEMC01079980.1	AT2G03090	EXPA15				Х		GEMC01033825.1	AT1G32170	XTH30
	Х		Х	Х	GEMC01009420.1	AT4G38210	EXPA20						GEMC01073516.1	AT1G32170	XTH30
	Х	Х	Х		GEMC01018354.1	AT4G38210	EXPA20			x		х	GEMC01038946.1	AT3G44990	XTH31
	Х		Х	Х	GEMC01024915.1	AT4G38210	EXPA20					Х	GEMC01033880.1	AT2G36870	XTH32
	Х		Х		GEMC01046018.1	AT2G20750	EXPB1			Х	х		GEMC01033882.1	AT2G36870	XTH32
	Х		Х	Х	GEMC01074049.1	AT2G20750	EXPB1		Х	х	Х		GEMC01033881.1	AT2G36870	XTH32
					GEMC01046017.1	AT4G28250	EXPB3						GEMC01033883.1	AT2G36870	XTH32
					GEMC01034615.1	A13G45970	EXLA1						GEMC01001112.1	AT1G10550	XTH33
				Х	GEMC01034616.1	AT3G45970	EXLA1								
		Х		Х	GEMC01034617.1	A [3G45970	EXLA1								
	Х	Х			GEMC01071493.1	AT3G45970	EXLA1								
					GEMC01040076.1	A [4G17030	EXLB1			-3) <mark>3</mark> log₂FC		
	X				GEMC01071739.1	A [4G17030	EXLB1						J 2		

(c)

Petiole Stängel

1d	2d	1d	2d	Nasturtium-ID	AGI	Annotation					
Х		Х		GEMC01044814.1	AT1G53830	PME2					
				GEMC01044813.1	AT3G14310	PME3					
		Х	Х	GEMC01051350.1	AT5G47500	PME5					
		х		GEMC01022684.1	AT2G26440	PME12					
X		Х	Х	GEMC01079103.1	AT2G26440	PME12					
				GEMC01044819.1	AT2G45220	PME17					
	Х		Х	GEMC01032904.1	AT3G29090	PME31					
Х		Х		GEMC01051479.1	AT3G49220	PME34					
Х			Х	GEMC01048741.1	AT4G33220	PME44					
	Х	Х	Х	GEMC01048742.1	AT4G33220	PME44					
Х	Х		Х	GEMC01074892.1	AT4G33220	PME44					
				GEMC01037686.1	AT3G59010	PME61					
		Х		GEMC01050465.1	AT1G11580	PMEPCRA					
				GEMC01037685.1	AT2G43050	ATPMEPCRD					
		х	х	GEMC01051482.1	AT5G53370	PMEPCRF					
	Х	Х	Х	GEMC01019636.1	AT1G02810	Plant invertase/pectin methylesterase inhibitor superfamily					
		Х	Х	GEMC01019637.1	AT1G02810	Plant invertase/pectin methylesterase inhibitor superfamily					
		Х	Х	GEMC01003862.1	AT3G05620	Plant invertase/pectin methylesterase inhibitor superfamily					
Х		Х	Х	GEMC01007840.1	AT3G05620	Plant invertase/pectin methylesterase inhibitor superfamily					
Х		Х	Х	GEMC01077599.1	AT3G05620	Plant invertase/pectin methylesterase inhibitor superfamily					
	Х		х	GEMC01051160.1	AT3G10720	Plant invertase/pectin methylesterase inhibitor superfamily					
				GEMC01052644.1	AT5G64640	Plant invertase/pectin methylesterase inhibitor superfamily					
				GEMC01016557.1	AT3G43270	Plant invertase/pectin methylesterase inhibitor superfamily					
Х		Х		GEMC01007079.1	AT3G47400	Plant invertase/pectin methylesterase inhibitor superfamily					
			х	GEMC01029803.1	AT5G19730	Pectin lyase-like superfamily protein					
		х		GEMC01075099.1	AT1G05310	Pectin lyase-like superfamily protein					

Abb. 14 Expressionsmuster von zellwandmodifizierenden Genen in Petiolen und Stängeln bei Überflutung. Heatmaps zeigen den \log_2 FC von (a) Expansinen (EXPs), (b) Xyloglucan-Endotransglucosylase/Hydrolasen (XTHs) und (c) Pektinmethylesterasen (PMEs) in Petiolen und Stängeln von *N. officinale* nach 1 d und 2 d Überflutung. Gelb repräsentiert induzierte und Cyan reprimierte Gene, Schwarz entspricht Genen, die weder induziert noch reprimiert sind (siehe \log_2 FC-Skala). Gene mit einem P_{adj} > 0,05 sind durch ein "x" gekennzeichnet. AGI-Gencodes wurden aus Sampedro & Cosgrove (2005) für (a), aus Yokoyama & Nishitani (2001) für (b) und aus Pelloux *et al.* (2007) für (c) entnommen.

0

3 log₂FC

Pet	iole	Stä	ngel				
1d	2d	1d	2d	Nasturtium-ID	AGI	Annotation	
Х		Х		GEMC01070221.1	AT3G54180	CDKB1:1	2
		Х		GEMC01032096 1	AT2G38620	CDKB1·2	-3
		~		CEMC01032030.1	AT2030020	CDKB1,2	
		~		GENICO 1030071.1	ATTG70540	CDKB2,1	
		Х		GEMC01036070.1	AT1G20930	CDKB2;2	
Х		Х	Х	GEMC01036073.1	AT1G20930	CDKB2;2	
Х		Х	Х	GEMC01029702.1	AT1G66750	CAK4	
		Х	Х	GEMC01040689.1	AT1G18040	CDKD1;3	
		Х		GEMC01041601.1	AT1G44110	CYCA1.1	
x		x	x	GEMC010139301	AT5G11300	CVC3B	
~		×	~	CEMC01013330.1	AT10011500	07030	
		^		GEMC01052019.1	ATTGISSTO	CYCAZ,3	
Х	Х	Х		GEMC01052020.1	AT1G15570	CYCA2;3	
X		Х		GEMC01013497.1	AT1G80370	CYCA2;4	
		Х		GEMC01023998.1	AT1G80370	CYCA2;4	
Х		Х		GEMC01027159.1	AT5G43080	CYCA3;1	
х		х	х	GEMC01027160 1	AT5G43080	CYCA3.1	
		х		GEMC01027161 1	AT5G43080	CVCA3·1	
		x		CEMC01027107.1	AT10040000	CVCA3.2	
		^		GEMC01027493.1	ATTG47210	CYCA3,2	
Х		Х	Х	GEMC01016543.1	AT1G47230	CYCA3;4	
Х		Х		GEMC01030145.1	AT4G37490	CYCB1;1	
		Х		GEMC01049723.1	AT5G06150	CYC1BAT	
		Х	Х	GEMC01014174.1	AT3G11520	CYCB1:3	
х		х	х	GEMC01032347.1	AT3G11520	CYCB1:3	
		х		GEMC01032348.1	AT3G11520	CVCB1.3	
~	-	~	~	GEMC010323401	AT3G11520	CVCB1:3	
^	X	^	~	GENICO 1032349.1	AT3011320	CYCD1,3	
	^		^	GEMC01013132.1	AT2G20700	CYCB1,4	
X		Х	х	GEMC01004109.1	A12G17620	CYCB2;1	
Х		Х	Х	GEMC01071487.1	AT2G17620	CYCB2;1	
		Х		GEMC01035926.1	AT4G35620	CYCB2;2	
Х		Х	Х	GEMC01035927.1	AT4G35620	CYCB2;2	
		Х	Х	GEMC01006684.1	AT1G20610	CYCB2;3	
		Х		GEMC01044336.1	AT1G76310	CYCB2:4	
	х	Х	х	GEMC01071919.1	AT1G76310	CYCB2:4	
х	Х	х		GEMC010048151	AT1G16330	CYCB3·1	
		Y		GEMC010154051	AT1G16330	CVCB3:1	
Y		Y	Y	CEMC010792401	AT1C16220	CVCP2:1	
~		X	X	GEMC01070240.1	AT1070330	CYCD1.1	
	X	~	~	GEMC01051004.1	ATTG70210		
	×	~	~	GEMC01050551.1	A12G22490	CYCD2;1	
Х				GEMC01047256.1	A14G34160	CYCD3;1	
Х			Х	GEMC01047262.1	AT4G34160	CYCD3;1	
			X	GEMC01060567.1	AT5G67260	CYCD3;2	
х		х	х	GEMC01060570.1	AT5G67260	CYCD3;2	
		Х		GEMC01014852.1	AT3G50070	CYCD3;3	
Х		Х	Х	GEMC01060568.1	AT3G50070	CYCD3:3	
		х	x	GEMC010173921	AT5G65420	CYCD4·1	
		Y	Y	GEMC010173031	AT5G65420	CYCD4:1	
~		~	~	CEMC010712221	AT5C10440	CVCD4;1	
^	V	~	~	GEMC01011322.1	AT3G10440	CYCD4,2	
	^	^	^	GEMC01002725.1	A14G03270	CYCD0;1	
X		Х		GEMC01032041.1	A14G03270	CYCD6;1	
Х		Х	Х	GEMC01018626.1	AT5G27620	CYCH;1	
Х	Х		Х	GEMC01022117.1	AT2G27960	CKS1	
		Х	Х	GEMC01019130.1	AT2G27970	CKS2	
		Х	Х	GEMC01019131.1	AT2G27970	CKS2	
х	х	х		GEMC01055984.1	AT3G48160	DEL1	
				GEMC01055985 1	AT3G48160	DFI 1	
Y		Y	Y	GEMC01045337.1	AT5G02470		
×	_	Y	Y	GEMC010453381	AT5C02470		
~		~	~	CEMC01045330.1	AT5C02470		
~		~	~	GEMC01040339.1	AT5G02470	DPA	
X		~	~	GENICU1U4UU61.1	A12G30U1U	EZF3	
Х		Х	Х	GEMC01020751.1	A12G23430	ICK1	
	Х	Х	Х	GEMC01023836.1	AT3G50630	KRP2	
		Х	Х	GEMC01023837.1	AT3G50630	KRP2	
				GEMC01028897.1	AT5G48820	ICK6	
				GEMC01039574.1	AT2G32710	KRP4	
X	Х	Х		GEMC01011494.1	AT3G19150	KRP6	
	х		Х	GEMC01011495.1	AT3G19150	KRP6	
		Х	х	GEMC01067533.1	AT3G12280	RBR1	
		Х		GEMC01025078.1	AT1G02970	WEE1	

Abb. 15 Expressionsmuster von Zellzyklus-assoziierten Genen in Petiolen und Stängeln bei Überflutung. Heatmap zeigt den log_2FC in Petiolen und Stängeln von *N. officinale* nach 1 d und 2 d Überflutung. Gelb repräsentiert induzierte und Cyan reprimierte Gene, Schwarz entspricht Genen, die weder induziert noch reprimiert sind (siehe log_2FC -Skala). Gene mit einem P_{adj} > 0,05 sind durch ein "x" gekennzeichnet. AGI-Gencodes wurden aus Vandepoele *et al.* (2002) entnommen.

Peti	ole	Stä	ngel				
1d	2d	1d	2d	Nasturtium-ID	AGI	Annotation	_
		Х	Х	GEMC01057316.1	AT4G12620	ORC1B	<mark>-3 0 3</mark> log₂
Х		Х	х	GEMC01057318.1	AT4G12620	ORC1B	
Х		Х	Х	GEMC01013979.1	AT2G37560	ORC2	
		Х		GEMC01013981.1	A12G37560	ORC2	
Х		Х	Х	GEMC01013982.1	A12G37560	ORC2	
		X	X	GEMC01057500.1	A15G16690	ORC3	
		х	Х	GEMC01057503.1	A15G16690	ORC3	
	Х	X		GEMC01009186.1	A14G29910	ORC5	
		X		GEMC01037366.1	AT1G26840	URC6	
х		X		GEMC01054888.1	AT1G79150	NOC3	
		×		GEMC01008414.1	ATTG44900		
		×		GEMC01058181.1	AT3G40280		
		~	×	GEMC01049501.1	AT2G10440		
		× ×	~	GEMC01074755.1	AT2G10440		
		~		GEMC01000922.1	ATEC44625		
×		× ×	~	GEMC01012249.1	AT3G44033		
^		~	^	GEMC01013020.1	AT4G02000		
		^		GEMC01040554.1	AT4G02000		
		Y	Y	GEMC01031291.1	AT2G29000		
x		×	×	GEMC010042300.1	AT3G54710	CDT1R	
		Y		GEMC010121021	AT3G25100	CDC45	
X		X	x	GEMC01012103.1	AT3G25100	CDC45	
X_		X	x	GFMC01070166 1	AT3G25100	CDC45	
		X	~	GEMC010250201	AT3G09660	MCM8	
		x	x	GEMC010717511	AT3G09660	MCM8	
x		x	x	GEMC01079289.1	AT3G09660	MCM8	
^	х	x	×	GEMC010158361	AT2G14050	MCM9	
X	X	X	~	GEMC01077879.1	AT2G14050	MCM9	
		х		GEMC01043761.1	AT2G20980	MCM10	
		х	х	GEMC01062618.1	AT1G77320	MEI1	
		х		GEMC01000334.1	AT4G02110	transcription coactivator	
х		X	х	GEMC01000335.1	AT4G02110	transcription coactivator	
x		х	х	GEMC01004685.1	AT4G02110	transcription coactivator	
x		х		GEMC01004686.1	AT4G02110	transcription coactivator	
		х		GEMC01011798.1	AT4G02110	transcription coactivator	
		х		GEMC01005225.1	AT1G80190	PSF1	
		х		GEMC01035925.1	AT3G12530	PSF2	
х		х	Х	GEMC01080306.1	AT5G49010	SLD5	
		х		GEMC01068182.1	AT5G67100	ICU2	
		х		GEMC01068186.1	AT5G67100	ICU2	
		х	Х	GEMC01003788.1	AT1G67630	POLA2	
		Х		GEMC01031432.1	AT1G67320	EMB2813	
		Х		GEMC01041530.1	AT5G41880	POLA3	
		Х		GEMC01037549.1	AT2G42120	POLD2	
	Х	Х	Х	GEMC01037551.1	AT2G42120	POLD2	
		Х	Х	GEMC01041743.1	AT1G78650	POLD3	
		Х		GEMC01073081.1	AT1G78650	POLD3	
				GEMC01017289.1	AT1G07370	PCNA1	
		Х		GEMC01017288.1	AT2G29570	PCNA2	
X		Х	Х	GEMC01064727.1	AT5G22010	RFC1	
X		Х	Х	GEMC01036913.1	AT1G63160	RFC2	
K		Х	Х	GEMC01038650.1	AT1G21690	EMB1968	
		Х		GEMC01048439.1	AT5G08020	RPA70B	
		Х		GEMC01048438.1	AT5G61000	RPA70D	
		Х		GEMC01027702.1	AT2G24490	RPA2	
×		Х	Х	GEMC01029190.1	AT3G02920	RPA32B	
	Х	Х	Х	GEMC01029192.1	AT3G02920	RPA32B	
ĸ		Х	Х	GEMC01020314.1	AT3G52630	RPA3A	
		Х		GEMC01020315.1	AT3G52630	RPA3A	
				GEMC01020316.1	AT3G52630	RPA3A	
		Х		GEMC01037452.1	AT5G26680	FEN1	
X		Х	Х	GEMC01032728.1	AT5G53070	Rnase H1	
Х		Х	Х	GEMC01032729.1	AT5G53070	Rnase H1	
Х		Х		GEMC01032730.1	A15G53070	Rnase H1	
			Х	GEMC01042050.1	A12G25100	Polynucleotidyl transferase	
Х		Х		GEMC01048789.1	AT1G08130	LIG1	

Abb. 16 Expressionsmuster von DNA-Replikation-assoziierten Genen in Petiolen und Stängeln bei Überflutung. Heatmap zeigt den $\log_2 FC$ in Petiolen und Stängeln von *N. officinale* nach 1 d und 2 d Überflutung. Gelb repräsentiert induzierte und Cyan reprimierte Gene, Schwarz entspricht Genen, die weder induziert noch reprimiert sind (siehe $\log_2 FC$ -Skala). Gene mit einem P_{adj} > 0,05 sind durch ein "x" gekennzeichnet. AGI-Gencodes wurden aus Shultz *et al.* (2007) entnommen.

3.3.3 Identifizierung von Referenzgenen zur Transkriptnormalisierung

Da die Transkriptomanalyse nur den Zustand nach 1 d und 2 d widerspiegelt, sollte die Expression einiger Gene in einer zeitabhängigen Expressionsanalyse mittels qRT-PCR untersucht werden. Bisher wurde die Genexpression von *N. officinale* in Reaktion auf Überflutung noch nicht mittels qRT-PCR getestet, weshalb noch keine geeigneten Referenzgene für Überflutungsexperimente bekannt sind. In der Vergangenheit wurden für *A. thaliana* häufig *EF-1a* (*elongation factor-1a*), Aktin- oder Tubulin-Gene als Referenzgene verwendet, deren Expression aber häufig als instabil gilt (Czechowski *et al.*, 2005). Aufgrund dessen war es notwendig, zunächst geeignete Referenzgene mit einer stabilen Genexpression zu identifizieren, um eine relative Quantifizierung der Gene von Interesse ermöglichen zu können. Basierend auf der Studie von Czechowski *et al.* (2005) und einem log₂FC zwischen -1 und 1 (entspricht weder Induktion noch Repression in Reaktion auf Überflutung) wurden einige potenzielle Referenzgene ausgewählt (Tab. A8). In einer qRT-PCR wurde deren Expressionsstabilität in Abhängigkeit von Zeit (0,5 h, 3 h, 6 h und 8 h) und Behandlung (Kontrolle, Überflutung) in zwei unabhängigen Experimenten getestet (Abb. 17, Tab. 9).

Tab. 9 Vergleich der getesteten Referenzgene in Petiolen und Stängeln von *N. officinale*. Dargestellt sind die C_T (*cycle threshold*, Schwellenwertzyklus)-Mittelwerte \pm Standardabweichung aus Proben unterschiedlicher Zeitpunkte unter Kontrollund Überflutungsbedingungen aus zwei Replikaten (n= 16). "-": nicht getestet.

Nasturtium Gene	C _T -Wert Petiole	C _T -Wert Stängel
NoCBP20	$\textbf{24,90} \pm \textbf{0,64}$	$\textbf{24,61} \pm \textbf{0,22}$
NoCYP57	$\textbf{26,}\textbf{48}\pm\textbf{0,}\textbf{63}$	-
NoPP2AA3	-	$\textbf{25,06} \pm \textbf{1,03}$
NoRPL13e	$\textbf{25,83} \pm \textbf{0,76}$	$\textbf{25,38} \pm \textbf{0,30}$
NoTIP41	$\textbf{29,42} \pm \textbf{0,60}$	$\textbf{28,37} \pm \textbf{0,36}$
NoUPF0041	$\textbf{23,38} \pm \textbf{0,68}$	-

Für Stängelproben wurden die homologen Gene zu *CBP20* (*CAP-BINDING PROTEIN 20, AT5G44200*), *PP2AA3* (*PROTEIN PHOSPHATASE 2A SUBUNIT A3, AT1G13320*), *RPL13e* (*Ribosomal protein L13e family protein, AT5G23900*) und *TIP41* (*TAP42 INTERACTING PROTEIN OF 41 KDA, AT4G34270*) ausgewählt (Abb. 17a, Tab. 9). Bis auf *NoPP2AA3* zeigten alle getesteten Gene eine stabile Expression in allen getesteten Zeitpunkten und Behandlungen. Da *NoTIP41* einen sehr hohen C_T (*cycle threshold*, Schwellenwertzyklus)-Wert (28,37 ± 0,36) aufwies und somit die geringste Expressionsstärke der getesteten Referenzgene hatte, wurden stattdessen *NoCBP20* und *NoRPL13e* als Referenzgene für Stängelproben ausgewählt.

Für Petiolen wurden die homologen Gene zu *CBP20, CYP57 (CYCLOPHILIN 57, AT4G33060), RPL13e, TIP41* und *UPF0041 (Uncharacterized protein family, AT4G22310)* getestet (Abb. 17b). Im Vergleich zur

Expression in den Stängeln war die Expression in den getesteten Referenzgenen weniger stabil, denn die C_T-Werte hatten eine höhere Standardabweichung als in den Stängeln (Abb. 17b, Tab. 9). Der hohe C_T-Wert von *NoTIP41* konnte auch in den Petiolen bestätigt werden. Auf Basis der log₂FC-Werte (Tab. A8) und der C_T-Werte (Tab. 9) wurden letztendlich *NoCYP57* und *NoUPF0041* als Referenzgene für Petiolen ausgewählt.



Abb. 17 Analyse der Expressionsstabilität von potenziellen Referenzgenen in Stängeln und Petiolen. Zeitabhängige Expressionsanalyse von Referenzgenen unter Kontroll- und Überflutungsbedingungen in Stängeln (a) und Petiolen (b). Pro Zeitpunkt wurden Stängel und Petiolen von fünf Pflanzen vereint und der C_T (*cycle threshold*, Schwellenwertzyklus)-Wert mittels qRT-PCR bestimmt. Dargestellt sind die C_T-Werte aus zwei biologischen Replikaten (Rep).

3.3.4 Überflutungsinduziertes Stängelwachstum setzt ABA-Abbau voraus

Bei Reis und *Rumex* hängen Wachstumsförderung und -unterdrückung hauptsächlich mit der hormonellen Triade aus Ethylen, ABA und GA zusammen (Sasidharan & Voesenek, 2015). Überraschenderweise befanden sich unter den am stärksten angereicherten GO-Kategorien der Gencluster keine GO-Kategorien, die mit Ethylen, ABA oder GA assoziiert werden konnten. Dennoch wird im weiteren Verlauf die Rolle dieser Phytohormone bei den gegensätzlichen Wachstumsreaktionen bei *N. officinale* untersucht. Die Ab- oder Anwesenheit von ABA ist der Schlüsselschalter, der letztendlich die Wachstumsförderung bei *Ru. palustris* oder die Wachstumsunterdrückung bei *Ru. acetosa* bestimmt (Benschop *et al.*, 2005). Um herauszufinden, ob dies auch bei *N. officinale* der Fall ist, wurde das Expressionsniveau von ABA-Biosynthese- und Abbaugenen in Petiolen und Stängeln bei Überflutung betrachtet. Die Expression der homologen Biosynthesegene *NCED3* (*AT3G14440*), *AAO1* (*AT5G20960*) und *AAO3* (*AT2G27150*) sowie die Abbauenzyme ABA 8'-Hydroxylasen CYP707A1-A3 (*AT4G19230*, *AT2G29090*, *AT5G45340*) deuten auf eine Herunterregulierung der ABA-Biosynthese und auf eine Induktion von ABA-Abbauprozessen als Reaktion auf Überflutung hin (Abb. 18). Dieser Effekt war in beiden Geweben nach 1 d und 2 d vorhanden, was eine Abnahme des ABA-Gehalts bei Überflutung vermuten lässt.

Petiole Stängel										
	1d	2d	1d	2d	Nasturtium-ID	AGI	Annotation			
	Х	Х		Х	GEMC01062899.1	AT5G67030	ABA1/ZEP1	-3	0	3 log ₂ FC
					GEMC01055647.1	AT3G14440	NCED3			
	Х	Х		Х	GEMC01036800.1	AT1G52340	ABA2/SDR1			
					GEMC01045606.1	AT5G20960	AAO1			
	х	Х	х		GEMC01019484.1	AT2G27150	AAO3			
	х		х		GEMC01027761.1	AT1G16540	ABA3			
			Х	Х	GEMC01052952.1	AT4G19230	CYP707A1			
					GEMC01052954.1	AT4G19230	CYP707A1			
			Х	X	GEMC01029889.1	AT2G29090	CYP707A2			
	х		Х	Х	GEMC01029890.1	AT2G29090	CYP707A2			
					GEMC01029891.1	AT2G29090	CYP707A2			
					GEMC01029893.1	AT2G29090	CYP707A2			
		х	х	Х	GEMC01052951.1	AT5G45340	CYP707A3			
				Х	GEMC01071579.1	AT3G19270	CYP707A4			
		х		Х	GEMC01073822.1	AT3G19270	CYP707A4			
				Х	GEMC01015681.1	AT3G19270	CYP707A4			

Abb. 18 Expression von ABA-Biosynthese- und Abbaugenen bei Überflutung. Heatmap zeigt den log_2FC in Petiolen und Stängeln von *N. officinale* nach 1 d und 2 d Überflutung. Gelb repräsentiert induzierte und Cyan reprimierte Gene, Schwarz entspricht Genen, die weder induziert noch reprimiert sind (siehe log_2FC -Skala). Gene mit einem $P_{adj} > 0,05$ sind durch ein "x" gekennzeichnet. AGI-Gencodes wurden aus Finkelstein (2013) entnommen. Der Biosynthese- und Abbauweg ist in Abb. 2 dargestellt.

Um den Zeitpunkt der Induktion des ABA-Abbaus näher eingrenzen zu können, wurde das Expressionslevel des Biosynthesegens *NoNCED3* und der Abbaugene *NoCYP707A1* (*AT4G19230*) und *NoCYP707A2* (*AT2G29090*) zeitabhängig untersucht (Abb. 19a). In den Petiolen war die Expression von *NoNCED3* nach 3 h Überflutung signifikant verringert, während die Expression in den Stängeln leicht, aber nicht signifikant herunterreguliert war. Darüber hinaus kam es in beiden Geweben zu einer zeitabhängigen Induktion der ABA-Abbaugene, wobei das höchste Expressionsniveau von *NoCYP707A1* nach 8 h in den Stängeln und nach 24 h in den Petiolen auftrat. Die maximale Expressionsstärke von *NoCYP707A2* wurde in den Stängeln unmittelbar vor der Nachtperiode (6 h) und in den Petiolen nach 24 h und 48 h erreicht. Interessanterweise nahm der ABA-Gehalt bereits nach 1,5 h Überflutung in beiden Geweben signifikant ab und blieb im weiteren Verlauf des Experiments niedrig (Abb. 19b).



Abb. 19 Überflutungsinduziertes Stängelwachstum erfordert ABA-Abbau. (a) Zeitabhängige Expressionsanalyse von ABA-Biosynthese- (NoNCED3) und Abbaugenen (NoCYP707A1, NoCYP707A2). Pro Zeitpunkt wurden Stängel und Petiolen von fünf Pflanzen vereint. Das mRNA-Level wurde mittels gRT-PCR gemessen und zu NoCBP20 und NoRPL13e für Stängel und zu NoCYP57 und NoUPF0041 für Petiolen normalisiert. Graue Bereiche kennzeichnen die Nachtperiode, x-Achse ist nicht skaliert. Dargestellt ist der Mittelwert ± SEM aus vier biologischen Replikaten. Signifikante Unterschiede zwischen Kontrolle und Überflutung sind mit * gekennzeichnet: *, P < 0,05; **, P < 0,01; ***, P < 0,001 (zweifaktorielle ANOVA, Sidak Test). (b) ABA-Gehalt nimmt in Reaktion auf Überflutung ab. ABA-Quantifizierung in Kontroll- und Überflutungspflanzen (Daten wurden durch Pulu Sun und Robert Schuurink erhoben). Pro Zeitpunkt wurden Stängel und Petiolen von 20 Pflanzen vereint. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM aus drei biologischen Replikaten. Unterschiedliche Buchstaben repräsentieren signifikante Unterschiede mit P < 0,05 (zweifaktorielle ANOVA mit Tukey's HSD Test). Dabei zeigen Kleinbuchstaben die Signifikanz der Stängelproben und Großbuchstaben die Signifikanz der Petiolenproben an. (c) ABA inhibiert das überflutungsinduzierte Stängelwachstum. Pflanzen wurden in unterschiedlichen ABA-Konzentrationen und 0,01 % (v/v) Ethanol überflutet. (d) Chemische Inhibierung des ABA-Abbaus inhibiert teilweise das Stängelwachstum. Pflanzen wurden entweder mit 50 uM oder 100 uM Abscinazole-E3M (Abz-E3M) oder mock-Lösung (0,1 % (v/v) DMSO) vorbehandelt. (c)+(d) Die Länge des Stängels und der Petiole des jüngsten Blattes wurde vor und nach 24 h Behandlung gemessen. Das Wachstum [mm] entspricht der Differenz. Dargestellt ist der Mittelwert ± SEM aus drei biologischen Replikaten (n= 30). Unterschiedliche Buchstaben repräsentieren signifikante Unterschiede mit P < 0,05 (zweifaktorielle ANOVA mit Tukey's HSD Test). (d) Daten wurden durch Malte Bartylla erhoben.

Um die Rolle von ABA bei den beobachteten Wachstumsreaktionen weiter zu charakterisieren, wurden die Pflanzen in steigender ABA-Konzentration überflutet (Abb. 19c). Dies führte zu einer dosisabhängigen Unterdrückung des Stängelwachstums. Pflanzen, die in 10 µM ABA überflutet wurden, zeigten ähnliche Wachstumsreaktionen wie Kontrollpflanzen. Somit konnte gezeigt werden, dass ABA das Stängelwachstum hemmt. Im Gegensatz zu der starken Wirkung, die in den Stängeln beobachtet wurde, wurde die Unterdrückung des Wachstums in den Petiolen nicht durch exogenes ABA beeinflusst. Um zu testen, ob das überflutungsinduzierte Stängelwachstum ABA-Abbau voraussetzt, wurden die Pflanzen mit Abz-E3M, einem selektiven Inhibitor der CYP707As (Takeuchi *et al.*, 2016), behandelt. Wie erwartet wurde das Stängelwachstum bei Abz-E3M-behandelten Pflanzen gehemmt. Allerdings konnte das Stängelwachstum nicht auf das Niveau von Kontrollpflanzen herabgesetzt werden (Abb. 19d). Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass ein durch Überflutung induzierter ABA-Abbau das Stängelwachstum stimuliert, die Reaktion der Petiole jedoch nicht beeinflusst.

Es stellte sich nun die Frage, ob der beobachtete ABA-Abbau durch Ethylen reguliert wird, weshalb die Pflanzen mit der Ethylenvorstufe ACC behandelt wurden. Die Wirkung von ACC wurde durch die Expression von *NoARL (AT2G44080)*, einem ethylenresponsiven Gen in *A. thaliana* (Rai *et al.*, 2015), überprüft. Die Behandlung mit ACC führte weder zu einer signifikanten Herunterregulierung von *NoNCED3* noch zu einer Induktion der ABA 8'-Hydroxylase-Expression (Abb. 20), was darauf hindeutet, dass der überflutungsinduzierte ABA-Abbau wahrscheinlich nicht durch Ethylen hervorgerufen wird.



Abb. 20 ACC-Behandlung hat keinen Einfluss auf die Genexpression von NoNCED3, NoCYP707A1 und NoCYP707A2. Die Pflanzen wurden mit mock-Lösung (0,1 % (v/v) Ethanol) oder mit 100 μ M ACC besprüht. Pro Zeitpunkt wurden Stängel und Petiolen von fünf Pflanzen vereint. Das mRNA-Level wurde mittels qRT-PCR gemessen und zu *NoCBP20* und *NoRPL13e* für Stängel und zu *NoCYP57* und *NoUPF0041* für Petiolen normalisiert. *NoARL* (*AT2G44080*) wurde als Positivkontrolle für die ACC-Behandlung verwendet (Rai *et al.*, 2015). Graue Bereiche kennzeichnen die Nachtperiode, x-Achse ist nicht skaliert. Dargestellt ist der Mittelwert ± SEM aus drei biologischen Replikaten (Daten wurden durch Malte Bartylla erhoben). Signifikante Unterschiede zwischen mock- und ACC-Behandlung sind mit **, *P* < 0,01 bzw. ***, *P* < 0,001 (zweifaktorielle ANOVA, Sidak Test) gekennzeichnet.

3.3.5 Ethylen beeinflusst die Unterwasser-Wachstumsreaktionen nur geringfügig

Da der ABA-Abbau in *N. officinale* wahrscheinlich nicht durch Ethylen induziert wird, sollte herausgefunden werden, ob Ethylen die Unterwasser-Wachstumsreaktionen überhaupt beeinflusst. Eine Expressionsanalyse von homologen Transkripten, die für die Ethylenbiosyntheseenzyme ACS (*AT2G22810, AT4G26200, AT4G08040, AT5G51690*) und ACO (*AT2G19590, AT1G62380, AT1G77330*) codieren, zeigte eine erhöhte Expression in beiden Geweben nach 1 d und 2 d Überflutung (Abb. 21), was auf eine verstärkte Ethylenbiosynthese hindeutet.

Petiole Stängel									
1d	2d	1d	2d	Nasturtium-ID	AGI	Annotation			
Х			Х	GEMC01001547.1	AT2G22810	ACS4	-3	0	3 log ₂ FC
	Х		Х	GEMC01002967.1	AT2G22810	ACS4			J.
	Х	Х	Х	GEMC01078903.1	AT2G22810	ACS4			
Х				GEMC01045853.1	AT4G11280	ACS6			
		Х	X	GEMC01009621.1	AT4G26200	ACS7			
				GEMC01023752.1	AT4G26200	ACS7			
		Х		GEMC01023753.1	AT4G26200	ACS7			
				GEMC01023754.1	AT4G26200	ACS7			
Х	Х		Х	GEMC01055461.1	AT1G62960	ACS10			
		Х	X	GEMC01040347.1	AT4G08040	ACS11			
	Х	Х	Х	GEMC01040348.1	AT4G08040	ACS11			
Х				GEMC01042277.1	AT5G51690	ACS12			
Х		Х		GEMC01042279.1	AT5G51690	ACS12			
				GEMC01034197.1	AT2G19590	ACO1			
				GEMC01043826.1	AT1G62380	ACO2			
Х	Х	Х		GEMC01043828.1	AT1G62380	ACO2			
Х		Х	Х	GEMC01009145.1	AT1G05010	ACO4			
	Х	Х	х	GEMC01072198.1	AT1G05010	ACO4			
Х	Х	Х		GEMC01031664.1	AT1G77330	ACO5	-		

Abb. 21 Expression von Ethylen-Biosynthesegenen bei Überflutung. Heatmap zeigt den log_2FC in Petiolen und Stängeln von *N. officinale* nach 1 d und 2 d Überflutung. Gelb repräsentiert induzierte und Cyan reprimierte Gene, Schwarz entspricht Genen, die weder induziert noch reprimiert sind (siehe log_2FC -Skala). Gene mit einem P_{adj} > 0,05 sind durch ein "x" gekennzeichnet. AGI-Gencodes wurden aus Schaller & Kieber (2002) entnommen. Der Biosyntheseweg ist in Abb. 1 dargestellt.

Es konnte eine zeitabhängige Induktion von *NoACS7* (*AT4G26200*) in den Petiolen bei Überflutung nachgewiesen werden, mit der höchsten Expression nach 24 h (Abb. 22a). Das Expressionsniveau in den Stängeln stieg erst nach 48 h Überflutung an und war niedriger als in den Petiolen. Die Expression von *NoACO1* (*AT2G19590*) stieg in beiden Geweben mit der Zeit signifikant an, insbesondere während der Nacht (8 h). Um den Einfluss von Ethylen auf das Stängel- und Petiolenwachstum bei Überflutung weiter zu untersuchen, wurden die Pflanzen mit Ethyleninhibitoren vorbehandelt. Zu den Inhibitoren zählten 1-MCP (Abb. 22b), welches die Ethylen-Rezeptoren blockiert, und der Biosyntheseinhibitor AVG (Abb. 22c), welcher das ACS-Enzym hemmt. Die Hemmung der Biosynthese und der Signalüber-tragung blockierten das Unterwasser-Stängelwachstum nur teilweise und hatte keinen Einfluss auf die Unterdrückung des Petiolenwachstums. Eine Behandlung mit Ethylen (Abb. 22d) oder ACC (Abb. 22e) in Luft führte zu einer signifikanten Zunahme des Stängelwachstums, jedoch nicht in vollem Umfang der Überflutungsreaktion (Abb. 22b,c, mock). Dies lässt vermuten, dass Ethylen bei den gegensätz-lichen Wachstumsreaktionen bei Überflutung nur eine untergeordnete Rolle spielt.



Abb. 22 Einfluss von Ethylen auf die gewebespezifischen Wachstumsreaktionen bei Überflutung. (a) Zeitabhängige Expressionsanalyse der Ethylen-Biosynthesegene NoACS7 und NoACO1. Pro Zeitpunkt wurden Stängel und Petiolen von fünf Pflanzen vereint. Das mRNA-Level wurde mittels qRT-PCR gemessen und zu NoCBP20 und NoRPL13e für Stängel und zu NoCYP57 und NoUPF0041 für Petiolen normalisiert. Graue Bereiche kennzeichnen die Nachtperiode, x-Achse ist nicht skaliert. Dargestellt ist der Mittelwert ± SEM aus vier biologischen Replikaten. Signifikante Unterschiede zwischen Kontrolle und Überflutung sind mit ***, P < 0,001 (zweifaktorielle ANOVA, Sidak Test) gekennzeichnet. Inhibierung der Ethylen-Signaltransduktion (b) und der Ethylen-Biosynthese (c) hemmt das Stängelwachstum nur teilweise. Die Pflanzen wurden mit 10 ppm 1-MCP für 1 h in einem Exsikkator vor der Überflutung vorbehandelt (b). Die Pflanzen wurden mit 50 μM AVG bzw. mock-Lösung (Wasser) vor der Überflutung besprüht (c). Ethylen (d) und ACC (e) induzierten das Stängelwachstum, haben aber keinen Einfluss auf die Wachstumsreaktion in der Petiole. Die Pflanzen wurden mit 10 ppm 1-MCP für 1 h in einem Exsikkator vor der Begasung mit 21 % O₂ ± Ethylen (≥ 2 ppm) vorbehandelt (d). (b)+(d) Die mock-Behandlung erfolgte für 1 h in einem Exsikkator ohne 1-MCP. (e) Die Pflanzen wurden vor dem Start des Experiments mit 100 μM ACC oder mock-Lösung (0,1% (v/v) Ethanol) besprüht. Die Länge des Stängels und der Petiole des jüngsten Blattes wurde vor und nach 24 h Behandlung gemessen. Das Wachstum [mm] entspricht der Differenz (b-e). Dargestellt ist der Mittelwert ± SEM aus drei biologischen Replikaten mit n= 40 (b), n= 30 (c, d), n= 45 (e). (c)+(e) Daten wurden durch Malte Bartylla erhoben. Signifikante Unterschiede sind folgendermaßen gekennzeichnet: ***, P < 0,001 (Student's t test, e), unterschiedliche Buchstaben mit P < 0,05 (zweifaktorielle ANOVA mit Tukey's HSD Test, b-d).

3.3.6 Die gegensätzlichen Wachstumsreaktionen werden nicht durch GA hervorgerufen

Es konnte gezeigt werden, dass Überflutung zu einer erhöhten GA-Biosynthese führt und GA das Unterwasser-Wachstum in der elongierenden Art *Ru. palustris,* aber nicht in der quiescenten Art *Ru. acetosa* fördert (Rijnders *et al.,* 1997). Um herauszufinden, ob GA eine Rolle bei den gegensätzlichen Wachstumsreaktionen bei *N. officinale* spielt, wurde zunächst das Expressionsniveaus von GA- Biosynthese- und Abbaugenen verglichen. Transkripte, die für das GA-Biosyntheseenzym GA20ox (*AT4G25420, AT5G51810*) codieren, akkumulierten signifikant, während Transkripte, die für GA3ox (*AT1G15550, AT1G80340*) codieren, stark herunterreguliert wurden (Abb. 23). Zusätzlich wurden homologe Transkripte induziert, die für das GA-Inaktivierungsenzym GA2ox (*AT1G30040*) codieren. Dies lässt vermuten, dass bei Überflutung in *N. officinale* nur inaktive GAs und keine bioaktiven GAs akkumulieren und deutet darauf hin, dass GA keine bedeutende Rolle bei den gewebespezifischen Wachstumsreaktionen spielt.

Um dies zu verifizieren, wurde die Expression von GA-Biosynthesegenen zeitabhängig untersucht und die Wachstumsreaktionen von Pflanzen bei GA-Mangel beobachtet (Abb. 24). Übereinstimmend mit der Transkriptomanalyse zeigte *NoGA20ox2* (*AT5G51810*) eine zeitabhängige Induktion in den Petiolen und eine signifikante Induktion nach 48 h in den Stängeln (Abb. 24a). In beiden Geweben war *NoGA3ox1* (*AT1G15550*) signifikant herunterreguliert, was wiederum darauf hinweist, dass die Synthese von bioaktiven GAs bei Überflutung nicht erhöht war.

	Pet	iole	Stängel							
I	1d	2d	1d	2d	Nasturtium-ID	AGI	Annotation			
			Х	Х	GEMC01021966.1	AT4G02780	CPS/GA1	-3	0	3 log ₂ FC
		Х			GEMC01012392.1	AT1G79460	KS/GA2			
	Х	Х	Х		GEMC01030784.1	AT5G25900	KO/GA3			
	Х	Х			GEMC01053952.1	AT1G05160	KAO1			
	Х		Х	Х	GEMC01005969.1	AT2G32440	KAO2			
	Х	Х	Х		GEMC01034516.1	AT4G25420	GA20OX1			
I					GEMC01016006.1	AT5G51810	GA20OX2			
					GEMC01013207.1	AT1G15550	GA3OX1			
					GEMC01078784.1	AT1G80340	GA3OX2			
	Х			х	GEMC01047602.1	AT1G78440	GA2OX1			
I		Х			GEMC01043027.1	AT1G30040	GA2OX2			
ſ					GEMC01043028.1	AT1G30040	GA2OX2			
	Х		Х	Х	GEMC01035828.1	AT1G02400	GA2OX6			
		х	Х	Х	GEMC01035829.1	AT1G02400	GA2OX6			
ſ	Х	Х	Х		GEMC01017054.1	AT4G21200	GA2OX8			

Abb. 23 Expression von GA-Biosynthese- und Abbaugenen bei Überflutung. Heatmap zeigt den log_2FC in Petiolen und Stängeln von *N. officinale* nach 1 d und 2 d Überflutung. Gelb repräsentiert induzierte und Cyan reprimierte Gene, Schwarz entspricht Genen, die weder induziert noch reprimiert sind (siehe log_2FC -Skala). Gene mit einem $P_{adj} > 0,05$ sind durch ein "x" gekennzeichnet. AGI-Gencodes wurden aus Sun (2008) entnommen. Der Biosynthese- und Abbauweg ist in Abb. 3 gezeigt.

Als nächstes wurden die Pflanzen mit 10 μ M und 100 μ M PAC behandelt, um die GA-Biosynthese zu hemmen, sodass sämtliche GAs vor Überflutung aufgebraucht wurden (Abb. 24b). Obwohl die Pflanzen einen typischen durch GA-Mangel hervorgerufenen Zwergphänotyp aufwiesen, zeigten sie noch immer verstärktes Stängelwachstum in Reaktion auf Überflutung. Die relative Elongationsfähigkeit von PAC-behandelten Pflanzen war sogar ähnlich zu mock-behandelten Pflanzen (Abb. 24c). Zusätzlich war die Wachstumsunterdrückung in den Petiolen nach PAC-Vorbehandlung unverändert (Abb. 24b, c). Selbst exogenes GA₃ führte zu keinem verstärkten Petiolenwachstum bei Überflutung. Die durch Überflutung induzierten gewebespezifischen Wachstumsreaktionen werden daher nicht durch GA vermittelt.



Abb. 24 Einfluss von GA auf die gewebespezifischen Wachstumsreaktionen bei Überflutung. (a) Zeitabhängige Expressionsanalyse der GA-Biosynthesegene *NoGa20ox2* und *NoGa3ox1*. Pro Zeitpunkt wurden Stängel und Petiolen von fünf Pflanzen vereint. Das mRNA-Level wurde mittels qRT-PCR gemessen und zu *NoCBP20* und *NoRPL13e* für Stängel und zu *NoCYP57* und *NoUPF0041* für Petiolen normalisiert. Graue Bereiche kennzeichnen die Nachtperiode, x-Achse ist nicht skaliert. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM aus vier biologischen Replikaten. Signifikante Unterschiede zwischen Kontrolle und Überflutung sind mit **, *P* < 0,01 bzw. ***, *P* < 0,001 (zweifaktorielle ANOVA, Sidak Test) gekennzeichnet. (b) Die Pflanzen wurden mit 10 µM, 100 µM Paclobutrazol (PAC) oder mock-Lösung (0,01 % (v/v) Ethanol) vorbehandelt und in Wasser mit 0,01 % (v/v) Ethanol oder 10 µM GA₃ überflutet. Die Länge des Stängels und der Petiole des jüngsten Blattes wurde vor und nach 24 h Behandlung gemessen. Das Wachstum [mm] entspricht der Differenz. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM aus drei biologischen Replikaten. (b)+(c) Unterschiedliche Buchstaben repräsentieren signifikante Unterschiede mit *P* < 0,05 (zweifaktorielle ANOVA mit Tukey's HSD Test).

3.3.7 Hypoxische Bedingungen treten nur bei Überflutung in Dunkelheit auf

Da der überflutungsinduzierte ABA-Abbau bereits sehr früh einsetzte, stellte sich die Frage, ob dies einen Einfluss auf die Wachstumsgeschwindigkeit des Stängels unter Wasser hat. Deshalb wurde das Wachstum von Stängel und Hypokotyl durch Verwendung eines Transducers in Echtzeit vermessen (Abb. 25a). Mit dieser Technik konnte festgestellt werden, dass die Wachstumsrate der Stängel unter Wasser tatsächlich bereits 2 h nach Überflutung mehr als viermal so hoch war wie die der Kontrollpflanzen. Die Wachstumsrate der überfluteten Pflanzen nahm im weiteren Tagesverlauf graduell ab und erreichte die Wachstumsrate von Kontrollpflanzen am Ende des Tages. Mit dem Einsetzen der Nacht stieg die Wachstumsrate in überfluteten Stängeln erneut und blieb um ein 7-faches erhöht im Vergleich zu Kontrollpflanzen. Auch am nächsten Tag blieb die Geschwindigkeit noch für etwa weitere 3 h erhöht, ehe sie erneut im weiteren Tagesverlauf abnahm. Aus diesem Verlauf wurde vermutet, dass der Unterschied im Wachstum zwischen Überflutungs- und Kontrollpflanzen hauptsächlich während der Nacht stattfindet.

Um herauszufinden, ob diese schnelle Wachstumsrate in der Nacht mit Änderungen im O₂-Status einhergehen, wurde der O₂-Status in den Stängeln und Petiolen in Abhängigkeit von Licht, Dunkelheit, Luft und Überflutung gemessen. (Abb. 25b, c, Abb. A6). Tatsächlich konnte eine Abnahme des O₂-Gehalts in beiden Geweben nur bei Überflutung in Dunkelheit festgestellt werden, wobei der O₂-Gehalt in den Stängeln geringfügig, aber nicht signifikant niedriger war als in den Petiolen. Darüber hinaus war die Rate der Dunkelatmung in den Stängeln signifikant höher als in den Petiolen (Abb. 25d). Der Wechsel von Überflutung in Dunkelheit zu Überflutung im Licht führte zu einem hyperoxischen Zustand in beiden Geweben (Abb. 25b, c). Gleichzeitig erhöhte sich die Wachstumsrate der Stängel erneut, was auf einen verbesserten Energiestatus nach erneuter Belichtung hinweist.

Übereinstimmend mit der Transkriptomanalyse wurden nur wenige Hypoxie-responsive Gene (HRGs), z. B. ACO1, ETHYLENE RESPONSE 2 (ETR2, AT3G23150), PHLOEM PROTEIN 2-A13 (PP2-A13, AT3G61060) und unbekannte Proteine (AT5G10040, AT1G19530, AT4G27450), bei Überflutung im Licht induziert (Abb. 26). Durch eine zeitabhängige Analyse der Expression von drei zentralen Hypoxie-Markergenen, NoADH1 (ALCOHOL DEHYDROGENASE 1, AT1G77120), NoGLB1 (CLASS I HEMOGLOBIN, AT2G16060) und NoLBD41 (LATERAL ORGAN BOUNDARIES DOMAIN-CONTAINING PROTEIN 41, AT3G02550), konnte bestätigt werden, dass bei N. officinale hypoxische Bedingungen nur bei Überflutung in Dunkelheit auftreten (Abb. 25e). Schließlich wurde untersucht, ob die schnelle Wachstumsrate während der Nacht bzw. bei Überflutung in Dunkelheit tatsächlich durch Hypoxie verursacht wird. Deshalb wurde das Stängelwachstum von Pflanzen verglichen, die unter Kurztag- und unter Dauerlichtbedingungen überflutet wurden (Abb. 25f). Im letzteren Fall würden in Pflanzengeweben keine hypoxischen Bedingungen hervorgerufen werden. Trotz des Fehlens einer Nachtperiode gab es keinen signifikanten Unterschied im Stängelwachstum, was darauf hinweist, dass das Stängelwachstum keinen O₂-Mangel erfordert.


Abb. 25 Hypoxische Bedingungen treten nur bei Überflutung in Dunkelheit auf. (a) Elongationsrate von Hypokotyl und des ältesten Internodiums bei Überflutung (dunkelblau) und unter Kontrollbedingungen (hellblau). Der Start des Experiments entspricht dem Zeitpunkt 0 h, graue Bereiche repräsentieren die Nachtperiode. Gezeigt sind Mittelwert ± SEM von jeweils fünf Pflanzen pro Behandlung. (b)+(c) Gewebe-O2 in Stängeln oder Petiolen in Reaktion auf den Wechsel von Licht zu Dunkelheit mit Spross in Luft oder überflutet. Der O2-Microsensor wurde 550-600 µm in den Stängel und 200-225 µm in die Petiole platziert. Dargestellt ist ein Beispiel (b) und die Zusammenfassung (c) aus sechs Pflanzen in einem Box-Whisker Graph (horizontale Linie = Median, + = Mittelwert, Boxen und Fehlerbalken= min-max). Unterschiedliche Buchstaben repräsentieren signifikante Unterschiede mit P < 0,05 (zweifaktorielle ANOVA mit Sidak Test), wobei Kleinbuchstaben Stängelproben und Großbuchstaben Petiolenproben repräsentieren. Die gestrichelte Linie zeigt das Gleichgewicht von O2 in Luft bei 23 °C. (d) Dunkelatmung von Stängeln (blau) und Petiolen (grün). Dargestellt ist der Mittelwert ± SEM aus n= 4. Signifikante Unterschiede sind mit **, P < 0,01 (Student's t-test) gekennzeichnet. (b)-(d) Daten wurden durch Ole Pedersen erhoben. (e) Zeitabhängige Expressionsanalyse von Hypoxie-Markergenen (NoADH1, NoGLB1, NoLBD41). Pro Zeitpunkt wurden Stängel und Petiolen von fünf Pflanzen vereint. Das mRNA-Level wurde mittels qRT-PCR gemessen und zu NoCBP20 und NoRPL13e für Stängel und zu NoCYP57 und NoUPF0041 für Petiolen normalisiert. Graue Bereiche kennzeichnen die Nachtperiode, x-Achse ist nicht skaliert. Dargestellt ist der Mittelwert ± SEM aus vier biologischen Replikaten. Signifikante Unterschiede zwischen Kontrolle und Überflutung sind mit ***, P < 0,001 (zweifaktorielle ANOVA, Sidak Test) gekennzeichnet. (f) Pflanzen wurden für 24 h entweder unter Kurztagbedingungen (8 h Licht / 16 h Dunkelheit, dunkelblau) oder Dauerlicht (24 h Licht, gelb) überflutet (Daten wurden durch Malte Bartylla erhoben). Dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM aus drei biologischen Replikaten mit n= 30; ns = nicht signifikant (Student's t-test, P = 0,09).

										Ę	-										protein	ase																									
Annotation	TID domain containing protain	TIP domain-containing protein TIP domain-containing protein				JAZ3/JAI3	JAZ3/JAI3	CML38	CML38	wound-responsive family protei	wound-responsive family protei	SR05	RBOHD				Rhodanese	ACR7	ACR7	ACR7	mitochondrial substrate carrier family	haloacid dehalogenase-like hydro	ACHT5	ACHT5	ACHT5	ACHT5	ACHT5	HUP9	HUP9	HUP36	HUP36	HUP36	HUP39	HUP39	HUP39				ATFF2-ATT HIID6				PHL1	SADE) -)	3 log ₂ FC
νGI	AT4C72040	AT1672940	AT3G17860	000/10014	A13G1/000	A13G17860	AT3G17860	AT1G76650	AT1G76650	AT4G33560	AT4G10270	AT5G62520	AT5G47910	AT5G58070	AT5G58070	AT5G58070	AT2G17850	AT4G22780	AT4G22780	AT4G22780	AT5G26200	AT5G44730	AT5G61440	AT5G61440	AT5G61440	AT5G61440	AT5G61440	AT5G10040	AT5G10040	AT1G19530	AT1G19530	AT1G19530	AT3G23170	AT3G23170	AT3G23170	A14624710	A10G00980	A14GZ1430	A11603090 AT2627220	AT40000E	A11633033 ATAC 30675	A TECSOOD	AT1635140	AT1G43800	AT1655810		0
Nasturtium-ID	CEMP0102022	GEMC010202211	GEMC01020281.1	0EM0010011001100.1	GEIMUU 1043002.1	GEMC01049859.1	GEMC01000372.1	GEMC01021515.1	GEMC01018452.1	GEMC01053350.1	GEMC01011308.1	GEMC01042808.1	GEMC01065190.1	GEMC01028412.1	GEMC01038718.1	GEMC01028413.1	GEMC01021208.1	GEMC01049354.1	GEMC01078544.1	GEMC01049356.1	GEMC01027744.1	GEMC01042707.1	GEMC01026669.1	GEMC01026668.1	GEMC01078630.1	GEMC01026670.1	GEMC01002608.1	GEMC01014718.1	GEMC01014719.1	GEMC01015658.1	GEMC01015657.1	GEMC01015659.1	GEMC01028157.1	GEMC01028158.1	GEMC01008935.1	GEMCU1025265.1	GEMCU10/02/8.1	GEIMCU1030314.1			AN AN		AN AN	AN AN	AN		<mark>የ</mark>
Petiole Stängel		× × × ×	× × × ×	< > < > >	< > < > < >	× × × ×	× × ×	×××	× × ×		× × ×	× × ×			× × ×		× × ×	× ×	× × ×		× ×	× × ×	× × × ×	× × ×	×	× × ×	×	×		××		×	×	× × ×		×	× × ×				NA NA NA NA NA NA NA NA			AN AN AN AN	NA NA NA NA		
Annotation	AI AAT4				ALAAIZ	ALAA12	ALAAT2	PC01	ADH1	PDC1	PDC1	PDC2	PDC2	NIP2:1	NIP2.1	PFK6	PFK6	PFK6	SUS4	SUS4	HRE2	LBD41	HRA1	HRA1	GLB1	AC01	AC01	ETR2	CYP707A3	EHL	EHL	EHL	hypothetical protein	hypothetical protein	senescence-associated family protein	seriescence-associated family protein	seriescence-associated laming protein	putative cyclin-dependent kinase	putative cyclin-dependent kinase	putative cyclin-dependent kinase	putative cyclin-dependent Minase phosphatidvlinositol 3- and 4-kinase	phoophatay intoined and 4 kinase	phosphardymositol 3- and 4-kinase	ATPP2-A13	ATPP2-A13	C3HC4 zinc finger protein	C3HC4 zinc finger protein
PGI	AT4C47200	AT161790	AT1672330		A116/2330	A11G72330	AT1G72330	AT5G15120	AT1G77120	AT4G33070	AT4G33070	AT5G54960	AT5G54960	AT2G34390	AT2G34390	AT4G32840	AT4G32840	AT4G32840	AT3G43190	AT3G43190	AT2G47520	AT3G02550	AT3G10040	AT3G10040	AT2G16060	AT2G19590	AT2G19590	AT3G23150	AT5G45340	AT5G02200	AT5G02200	AT5G02200	AT5G47060	AT5G47060	A14G1/6/0	A14G1/0/U	A14G1/0/0	AT1014940	AT1G74940	010120110	AT1G76270	AT1626270	AT1G26270	AT3G61060	AT3G61060	AT5G42200	AT5G42200
Nasturtium-ID	CEMPO1067419 1	GEMC01001410.1	GEMC0100013011		GEMCU1003543.1	GEMC01008056.1	GEMC01048151.1	GEMC01016574.1	GEMC01049176.1	GEMC01059055.1	GEMC01059052.1	GEMC01048385.1	GEMC01048384.1	GEMC01070831.1	GEMC01074781.1	GEMC01000775.1	GEMC01048299.1	GEMC01048300.1	GEMC01066529.1	GEMC01066534.1	GEMC01009329.1	GEMC01017850.1	GEMC01078208.1	GEMC01000382.1	GEMC01027086.1	GEMC01034198.1	GEMC01034197.1	GEMC01061981.1	GEMC01052951.1	GEMC01016467.1	GEMC01073061.1	GEMC01016466.1	GEMC01024956.1	GEMC01024955.1	GEMC01028564.1	DEMCU1020303.1	GEMCU1003083.1	CEMC0101101101	GEMC01031000.1	CEMPO10410340074	GEMC01031861.1 GEMC01076324.1	CEMC01051702 1	GEMC0107173230.1	GEMC010373571	GEMC01037359.1	GEMC01075619.1	GEMC01022252.1
Petiole Stängel		× × × × ×	× × ×	< > < > < >	< 2 < 2 < 2	× : × : :	× × ×	× × × ×	×			× × ×	× × ×	× × × ×	× × ×	× × × ×	× × × ×			××	× × ×	× × ×	× × ×	× × ×	×	× × ×			× × ×	× × ×	× × ×	× × ×	× :	× :	× > >	< > > < > >	< > < > < >	< < > < >	× × × ×	 × × × × × × 	< ×		× ×			× × ×	× × ×

Abb. 26 Expression der Hypoxie-responsiven Gene (HRGs) bei Überflutung. Heatmap zeigt den log₂FC in Petiolen und Stängeln von *N. officinale* nach 1 d und 2 d Überflutung. Gelb repräsentiert induzierte und Cyan reprimierte Gene, Schwarz entspricht Genen, die weder induziert noch reprimiert sind (siehe log₂FC-Skala). Gene mit einem *P_{ad}>* 0,05 sind durch ein "x" gekennzeichnet. AGI-Gencodes wurden aus Mustroph *et al.* (2009) entnommen. NA: Gene sind nicht im Datensatz von *N. officinale* exprimiert.

3.3.8 Brassinosteroide sind nicht an den gewebespezifischen Reaktionen beteiligt

Die GO-Analyse zeigte eine Anreicherung der GO-Kategorie "response to brassinosteroids" im gewebeunspezifischen Cluster 3. Sowohl BR-Biosynthesegene als auch BR-Abbaugene waren bei Überflutung in Petiolen und Stängeln induziert (Abb. 27). Um bestätigen zu können, dass BRs nicht allein für die gegensätzlichen Überflutungsreaktionen verantwortlich sind, wurden die Pflanzen mit BRZ, einem Inhibitor der BR-Biosynthese (Asami *et al.*, 2000), vorbehandelt. Dadurch wurden den Pflanzen vor Überflutung BRs entzogen und die Pflanzen zeigten einen Zwergphänotyp. Dennoch wies der Stängel weiterhin ein verstärktes Wachstum bei Überflutung auf, während die Petiole bereits unter Kontrollbedingungen ein stark eingeschränktes Wachstum zeigte und keine weitere Veränderung bei Überflutung (Abb. 28). Somit sind BRs vermutlich nicht an den gewebespezifischen Wachstums-reaktionen bei Überflutung beteiligt.

Pet	iole	Stär	ngel							
1d	2d	1d	2d	Nasturtium-ID	AGI	Annotation				
				GEMC01050981.1	AT5G05690	CPD	-3	0	3	log ₂ FC
				GEMC01050984.1	AT5G05690	CPD				<u>J</u> 2
	Х	Х	Х	GEMC01037592.1	AT3G50660	DWF4				
				GEMC01053798.1	AT4G36380	ROT3				
				GEMC01041275.1	AT3G30180	BR6OX2				
Х		Х		GEMC01010345.1	AT2G26710	BAS1				
Х		Х		GEMC01015376.1	AT2G26710	BAS1				
Х		Х		GEMC01024401.1	AT2G26710	BAS1				
Х		Х		GEMC01024402.1	AT2G26710	BAS1				
х	Х		Х	GEMC01024403.1	AT2G26710	BAS1				
Х		х	Х	GEMC01049327.1	AT2G36800	UGT73C5				

Abb. 27 Expression von BR-Biosynthese- und Abbaugenen bei Überflutung. Heatmap zeigt den log_2FC in Petiolen und Stängeln von *N. officinale* nach 1 d und 2 d Überflutung. Gelb repräsentiert induzierte und Cyan reprimierte Gene, Schwarz entspricht Genen, die weder induziert noch reprimiert sind (siehe log_2FC -Skala). Gene mit einem P_{adj} > 0,05 sind durch ein "x" gekennzeichnet. Die relevanten Gene wurden anhand von Clouse (2011) und Fujioka & Yokota (2003) ermittelt, und die entsprechenden AGI-Gencodes wurden anschließend mittels arabidopsis.org identifiziert. Der Biosynthese- und Abbauweg ist in Abb. 5 dargestellt.



Abb. 28 Brassinosteroide sind vermutlich nicht an den gewebespezifischen Wachstumsreaktionen beteiligt. Chemische Inhibierung der BR-Biosynthese inhibiert nur teilweise das überflutungsinduzierte Stängelwachstum und führt zu eingeschränktem Wachstum unter Kontrollbedingungen. Pflanzen wurden mit 20 μ M Brassinazole (BRZ) oder mock-Lösung (0,1 % (v/v) DMSO) vorbehandelt. Die Länge des Stängels und der Petiole des jüngsten Blattes wurde vor und nach 24 h Behandlung gemessen. Das Wachstum [mm] entspricht der Differenz. Dargestellt ist der Mittelwert ± SEM aus drei biologischen Replikaten (n= 30). Unterschiedliche Buchstaben repräsentieren signifikante Unterschiede mit P < 0,05 (zweifaktorielle ANOVA mit Tukey's HSD Test).

3.3.9 Der Einfluss von Auxin auf die gegensätzlichen Wachstumsreaktionen bleibt unklar Die GO-Analyse der gewebeunspezifisch induzierten Gene zeigte eine Anreicherung von Transkripten in der GO-Kategorie "response to auxin". Da Auxin bereits als Stimulator der Unterwasser-Elongation von anderen Arten, z. B. *Ru. palustris* (Cox *et al.*, 2004, 2006), bekannt ist, sollte der Einfluss von Auxin auf die Wachstumsreaktionen bei *N. officinale* näher betrachtet werden. Dazu wurde zunächst die Expressionsstärke der Gene des IAA-Biosynthesewegs nach 1 d und 2 d Überflutung in Petiolen und Stängeln betrachtet (Abb. 29). Während die Expression von *TAA1* in beiden Geweben herunterreguliert war, war die Expression von *YUC8* nur in den Petiolen signifikant erhöht. Die zeitabhängige Transkriptanalyse der IAA-Biosynthesegene ergab eine Repression von *NoTAA1* (*AT1G70560*) in beiden Geweben in Reaktion auf Überflutung, wobei dies in den Stängeln nach 3 h, 24 h und 48 h und in den Petiolen zusätzlich nach 6 h signifikant war (Abb. 30a). Die Expression von *NoYUC8* (*AT4G28720*) war in den Stängeln unverändert (Abb. 30a). In den Petiolen stieg die Expression nach 6 h signifikant an und blieb nach 8 h und 24 h signifikant erhöht, was eine erhöhte IAA-Biosynthese in den Petiolen vermuten lässt.

Pet	iole	Stä	ngel						
1d	2d	1d	2d	Nasturtium-ID	AGI	Annotation			
				GEMC01040452.1	AT1G70560	TAA1	-3	0	<mark>3</mark> loa₂FC
	Х	Х	Х	GEMC01014346.1	AT5G43890	YUC5			- J2 -
Х	Х		Х	GEMC01024607.1	AT5G25620	YUC6			
		Х	Х	GEMC01001927.1	AT4G28720	YUC8			
			Х	GEMC01016749.1	AT4G28720	YUC8			

Abb. 29 Expression der Gene des IAA-Biosynthesewegs bei Überflutung. Heatmap zeigt den \log_2 FC in Petiolen und Stängeln von *N. officinale* nach 1 d und 2 d Überflutung. Gelb repräsentiert induzierte und Cyan reprimierte Gene, Schwarz entspricht Genen, die weder induziert noch reprimiert sind (siehe \log_2 FC-Skala). Gene mit einem P_{adj} > 0,05 sind durch ein "x" gekennzeichnet. AGI-Gencodes wurden aus Zhao (2014) entnommen. Der Biosyntheseweg ist in Abb. 4 dargestellt.

Das meiste Auxin wird im Spross gebildet und entweder über das Phloem oder von Zelle zu Zelle über einen polaren Transport in der Pflanze verteilt (Friml, 2003; Tanaka *et al.*, 2006). Auxin kann entweder über Auxin-Influx-Carrier, z. B. AUXIN1 (AUX1)/LIKE-AUX1 (LAX)-Proteine (Bennett *et al.*, 1996; Yang *et al.*, 2006) oder durch passive Diffusion in die Zelle gelangen (Friml, 2003; Tanaka *et al.*, 2006). Letzteres ist nur in der protonierten, hydrophoben Form (IAAH) möglich, welche in der sauren Umgebung des Apoplasten (pH 5,5) vorliegen kann. Im Cytosol (pH 7,0) liegt IAA in der dissoziierten Form als Anion (IAA⁻) vor, wodurch es die Plasmamembran nicht passieren kann und nur durch kontrollierten Auxin-Efflux durch PIN FORMED (PIN)-Proteine (Billou *et al.*, 2005; Petrášek *et al.*, 2006) freigesetzt werden kann (Tanaka *et al.*, 2006). Die zelluläre Abundanz von Auxin hängt somit nicht nur von der Biosynthese, sondern auch von Auxin-Carrier-Proteinen ab. Um den Einfluss des Auxin-Effluxes auf die gewebespezifischen Wachstumsreaktionen in *N. officinale* bei Überflutung untersuchen zu können, wurden die Pflanzen mit NPA, einem Inhibitor des Auxin-Effluxes vorbehandelt (Thomson *et al.*, 1973).



Abb. 30 Einfluss von Auxin auf die gewebespezifischen Reaktionen auf Überflutung. (a) Zeitabhängige Expressionsanalyse der Auxin-Biosynthesegene *NoTAA1* und *NoYUC8*. Pro Zeitpunkt wurden Stängel und Petiolen von fünf Pflanzen vereint. Das mRNA-Level wurde mittels qRT-PCR gemessen und zu *NoCBP20* und *NoRPL13e* für Stängel und zu *NoCYP57* und *NoUPF0041* für Petiolen normalisiert. Graue Bereiche kennzeichnen die Nachtperiode, x-Achse ist nicht skaliert. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM aus vier biologischen Replikaten. Signifikante Unterschiede zwischen Kontrolle und Überflutung sind mit * gekennzeichnet: *, *P* < 0,05; **, *P* < 0,01; ***, *P* < 0,001 (zweifaktorielle ANOVA, Sidak Test). (b) Inhibierung des Auxin-Effluxes mit Naptalam (NPA) inhibiert das Stängelwachstum. Pflanzen wurden entweder mit 50 μ M NPA oder mock-Lösung (0,1% (v/v) DMSO) vorbehandelt. Die Länge des Stängels und der Petiole des jüngsten Blattes wurde vor und nach 24 h Behandlung gemessen. Das Wachstum [mm] entspricht der Differenz. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM aus drei biologischen Replikaten. (b)+(c) Unterschiedliche Buchstaben repräsentieren signifikante Unterschiede mit *P* < 0,05 (zweifaktorielle ANOVA mit Tukey's HSD Test).

In Reaktion auf die NPA-Behandlung zeigten die Pflanzen einen starken Zwergphänotyp und somit bereits unter Kontrollbedingungen ein eingeschränktes Wachstum (Abb. 30b). Bei Überflutung konnte im Stängel nur eine minimale, aber nicht signifikante Elongation und in der Petiole kein weiterer Einfluss auf das Wachstum festgestellt werden. Auch bei Betrachtung des relativen Wachstums konnte im Stängel kein signifikanter Unterschied zwischen mock- und NPA-behandelten Pflanzen festgestellt werden (Abb. 30c). Die Zugabe des synthetischen Auxins 2,4-D, welches durch Auxin-Influx in die Zelle aufgenommen wird (Delbarre *et al.*, 1996), führte in mock-behandelten Pflanzen zu keinem Effekt (Abb. 30b, c). In NPA-behandelten Pflanzen führte 2,4-D im Überflutungswasser zu einer signifikanten Elongation in den Stängeln (Abb. 30b, c). In der Petiole konnte zwar im relativen Wachstum ein signifikanter Unterschied zwischen mock- und NPA-behandelten Pflanzen festgestellt werden, allerdings ist das auf den Unterschied des Wachstums bei Kontrollbedingungen zurückzuführen (Abb. 30b, c). Zusammenfassend lässt sich keine eindeutige Aussage über den Einfluss von Auxin auf die gewebespezifischen Wachstumsreaktionen bei Überflutung treffen.

3.4 Identifizierung von Mechanismen der Überflutungstoleranz

3.4.1 Zusammenhang zwischen Überflutungstoleranz und Änderungen im Stoffwechsel Wie bereits in Abb. 9 gezeigt, konnten bei den Rosettenpflanzen mit einer *Quiescence*-Strategie Unterschiede bezüglich der Überflutungstoleranz beobachtet werden. Es stellte sich nun die Frage, ob diese im Zusammenhang mit Unterschieden im Stoffwechsel und der Aktivierung von Gärungsprozessen stehen. Um das herausfinden zu können, wurden die ADH-Enzymaktivität (Abb. 31) und die Zuckergehalte (Abb. 32) bei Überflutung und unter Kontrollbedingungen gemessen. Bei *A. thaliana* und *C. hirsuta* konnte kein signifikanter Unterschied in der ADH-Enzymaktivität zwischen Überflutung und Kontrollbedingungen nach 1 d und 2 d festgestellt werden. Im Gegensatz dazu zeigten *C. pratensis*, *R. palustris* und *R. sylvestris* eine signifikante Induktion der ADH-Enzymaktivität spätestens nach 2 d Überflutung. Folglich konnte eine signifikante Induktion der ADH-Enzymaktivität, als repräsentative Aktivierung von Gärungsprozessen bei Überflutung im Licht, nur in den toleranten Arten verzeichnet werden.



Abb. 31 Induktion der ADH-Enzymaktivität findet bei Überflutung nur in den toleranten Pflanzenarten statt. Etwa 3-4 Wochen-alte Pflanzen wurden unter Kurztagbedingungen überflutet (schwarz), als Kontrolle (weiß) dienten Pflanzen, welche weiter unter Kurztagbedingungen kultiviert wurden. Nach 1 d und 2 d wurden die jüngsten Blätter von fünf Pflanzen geerntet und die ADH-Enzymaktivität bestimmt (Daten wurden durch Marina Selle erhoben). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM aus 3-4 biologischen Replikaten. Unterschiedliche Buchstaben repräsentieren signifikante Unterschiede mit *P* < 0,05 (zweifaktorielle ANOVA mit Tukey's HSD Test).

Ein Vergleich der Glucose-, Fructose- und Saccharose-Konzentrationen zeigte bereits unter Kontrollbedingungen signifikante Unterschiede zwischen den untersuchten Arten (Abb. 32a, b). Insbesondere bei *R. sylvestris* und *C. pratensis* lagen die Zuckerkonzentrationen signifikant höher als bei den anderen Arten (Abb. 32b). Nach 1 d und 2 d Überflutung sanken die Zuckerkonzentrationen von *A. thaliana*, 65 *C. hirsuta* und *C. pratensis* auf nur 25 % der jeweiligen Kontrollen. Die Zuckergehalte relativ zur Kontrolle lagen bei *R. palustris* bei ca. 35 % nach 1 d und sogar bei 75 % nach 2 d Überflutung. Bei *R. sylvestris* lagen die Zuckerkonzentrationen ebenfalls nach beiden Tagen bei über 50 %. Somit scheint es zumindest bei den beiden *Rorippa*-Arten einen positiven Zusammenhang zwischen der Zuckerverfügbarkeit bei Überflutung und der Überflutungstoleranz zu geben.



Abb. 32 Überflutung führt zu einem stärkeren Verlust an Kohlenhydraten in *A. thaliana, C. hirsuta* und *C. pratensis,* im Vergleich zu *R. palustris* und *R. sylvestris.* Etwa 3-4 Wochen-alte Pflanzen wurden unter Kurztagbedingungen überflutet (schwarz), als Kontrolle (weiß) dienten Pflanzen, welche weiter unter Kurztagbedingungen kultiviert wurden. Nach 1 d und 2 d wurden die jüngsten Blätter von fünf Pflanzen geernet und die Konzentrationen von Glucose, Fructose und Saccharose (a) bestimmt. (b) Summe aus Glucose, Fructose und Saccharose. (c) Relative Daten zu (b), 1 d: hellgrau, 2 d: dunkelgrau. (a)-(c) Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM aus drei biologischen Replikaten. Unterschiedliche Buchstaben repräsentieren signifikante Unterschiede mit *P* < 0,05 (zweifaktorielle ANOVA mit Tukey's HSD Test).

3.4.2 Differenzielle Genanalyse bei Überflutung in den sensitiven und toleranten Arten Um die molekularen Mechanismen der Überflutungstoleranz identifizieren zu können, wurde ein RNA-seq Experiment nach 1 d und 2 d Überflutung durchgeführt, da hier die größten Unterschiede im Strategie-Experiment zu erkennen waren (Abb. 7a-e). Eine multidimensionale Skalierung der Transkripte zeigt für alle Arten eine Auftrennung nach Behandlung (Abb. 33a). Für *A. thaliana*, *C. hirsuta*, *R. palustris* und *R. sylvestris* (ausgenommen je ein Replikat bei 2 d) gab es keine Auftrennung nach Zeitpunkt, während sich die *C. pratensis*-Überflutungstranskripte nach Zeitpunkt gruppierten. Wie im *N. officinale*-Datensatz wurde auch hier die Anzahl der DEGs (P_{adj} < 0,05) bestimmt und wie folgt eingeteilt: $\log_2FC > 1$ entsprach induzierten und $\log_2FC < -1$ reprimierten DEGs (Abb. 33b).



Abb. 33 Übersicht der differenziell exprimierten Gene (DEGs) in Reaktion auf Überflutung. (a) Multidimensionale Skalierung (MDS) zeigt eine Auftrennung nach Behandlung. Der Abstand zwischen den Proben wurde auf der Grundlage der top 4000 paarweise kontrastierenden Genen berechnet. (b) Übersicht der Anzahl an differenziell exprimierten Genen (DEGs) nach 1 d und 2 d. Gelb repräsentiert induzierte und Cyan reprimierte DEGs. Die DEGs wurden anhand folgender Kriterien ausgewählt: $log_2FC > 1$ bzw. $log_2FC < -1$ und $P_{adj} < 0,05$.

Demnach wurden bei A. thaliana 1987 induzierte DEGs nach 1 d und 2553 nach 2 d sowie 1148 reprimierte DEGs nach 1 d und 2286 nach 2 d identifiziert. Das am stärksten induzierte Gen nach 1 d war TARGET OF RAPAMYCIN (TOR, AT1G50030.2, log₂FC= 14,14). Nach 2 d wurde *MOS4-ASSOCIATED COMPLEX 3 B* (*MAC3 B, AT2G33340.3,* log₂FC= 12,57) am stärksten induziert. Nach 1 d wurde Alba DNA/RNA-binding protein (AT3G07030.1, log₂FC= -11,06) und nach 2 d Ribonuclease III family protein (RNC4, AT3G13740.1, log₂FC= -11,90) am stärksten reprimiert. Weitere stark induzierte Gene waren SENESCENCE 1 (SEN1, bzw. DARK INDUCIBLE 1 / DIN1, AT4G35770), DARK INDUCIBLE 10 (DIN10, AT5G20250), RAP2.3 (AT3G16770), RAP2.6 (AT1G43160), THREONINE ALDOLASE 1 (THA1, AT1G08630) sowie MIOX2. Zu den stark reprimierten Genen zählten außerdem z. B. LEUCOANTHOCYANIDIN DIOXYGENASE (LDOX, AT4G22880), BCAT-4, IPMI1, IMD1 und LIPOXYGENASE 2 (LOX2, AT3G45140).

Bei *C. hirsuta* lag die Anzahl der induzierten DEGs nach 1 d bei 1975 und nach 2 d bei 2529, während die Anzahl der reprimierten DEGs nach 1 d bei 1333 und nach 2 d bei 1980 lag. Das am stärksten induzierte Transkript nach 1 d und 2 d war *Chr7_GG_1632_c0_g1_i1* (homolog zu *SEN1, AT4G35770,* log₂FC= 13,85 bzw. 12,41). Am stärksten reprimiert wurde nach 1 d *Chr5_GG_1298_c0_g1_i10* (homolog zu *BETA GLUCOSIDASE 7, BGLU7, AT3G62740,* log₂FC= -9,88) und nach 2 d *Chr8_GG_1607_c0_g1_i2* (homolog zu *Tetratricopeptide repeat (TPR)-like superfamily protein, AT3G51280,* log₂FC= -8,86). Zudem wurden homologe Gene zu *ECS1 (AT1G31580), NAC-LIKE, ACTIVATED BY AP3/PI (NAP, AT1G69490)* und *GLUTAMINE-DEPENDENT ASPARAGINE SYNTHASE 1* (*ASN1, AT3G47340*) stark induziert. Stark reprimiert wurden u. a. homologe Gene zu *LOX2, RESPONSE TO LOW SULFUR 4* (*LSU4, AT5G24655*) und *RESPONSE REGULATOR 7* (*ARR7, AT1G19050*).

Die Anzahl der DEGs bei *C. pratensis* war am niedrigsten im Vergleich zu den anderen Arten, mit 1237 und 1385 induzierten DEGs nach 1 bzw. 2 d sowie 952 und 1279 reprimierten DEGs nach 1 bzw. 2 d. Das am stärksten induzierte Transkript nach 1 d war *TRINITY_DN36205_c1_g1_i1* (homolog zu *aluminum induced protein with YGL and LRDR motifs, AT3G15450,* log₂FC= 14,02) und nach 2 d *TRINITY_DN49944_c0_g1_i4* (homolog zu *hydroxyproline-rich glycoprotein family protein, AT2G22180,* log₂FC= 15,20). Die am stärksten reprimierten Transkripte waren *TRINITY_DN35550_c1_g1_i5* (homolog zu *ACETYLATED INTERACTING PROTEIN 1, ACIP1, AT3G09980,* log₂FC= -13,34) nach 1 d und *TRINITY_DN40891_c0_g1_i1* (homolog zu *PEROXIDASE 52, PRX52, AT5G05340,* log₂FC= -16,11) nach 2 d. Zu den stark induzierten Genen zählten außerdem homologe Gene zu *BETA CARBONIC ANHYDRASE 3* (*BCA3, AT1G23730*), *B-BOX DOMAIN PROTEIN 30* (*BBX30, AT4G15248*), *ECS1* und *SEN1.* Dagegen wurden beispielsweise homologe Gene zu *TRAF-like family protein (ZW9, AT1G58270), LDOX* und *IMD1* stark reprimiert.

Bei *R. palustris* war die Anzahl der induzierten DEGs 2852 nach 1 d und 2384 nach 2 d und die Anzahl der reprimierten DEGs 2404 nach 1 d und 1815 nach 2 d. Nach 1 d wurde *TRINITY_DN39505_c1_g1_i1*

(homolog zu *CYTOKININ RESPONSE FACTOR 10, CRF10, AT1G68550,* log₂FC= 15,48) und nach 2 d *TRINITY_DN35218_c3_g1_i3* (homolog zu *Glycine-rich protein family, AT2G05540,* log₂FC= 15,43) am stärksten induziert. *TRINITY_DN33826_c3_g3_i2* (homolog zu *Putative endonuclease or glycosyl hydrolase, AT3G62050,* log₂FC= -11,93) wurde nach 1 d und *TRINITY_DN33687_c0_g1_i17* (homolog zu *Zinc finger C-x8-C-x5-C-x3-H type family protein, AT5G18550,* log₂FC= -15,39) nach 2 d am stärksten reprimiert. Zudem wurden u. a. homologe Gene zu *PPDK* (*AT4G15530*), *SEN1, DIN10, BBX30* und *ECS1* stark induziert sowie *POLYAMINE OXIDASE 4* (*PAO4, AT1G65840*), *ARR7* und *LOX2* stark reprimiert.

Die Anzahl der induzierten DEGs bei *R. sylvestris* lag bei 1794 nach 1 d und 2334 nach 2 d und die Anzahl der reprimierten DEGs lag bei 2308 nach 1 d und 2707 nach 2 d. *TRINITY_DN30684_c0_g2_i2* (homolog zu *ECS1*, log₂FC= 12,53) wurde dabei nach 1 d und *TRINITY_DN41318_c1_g2_i4* (homolog zu *LIGHT HARVESTING COMPLEX OF PHOTOSYSTEM II 5*, *LHCB5*, *AT4G10340*, log₂FC = 13,66) nach 2 d am stärksten induziert. *TRINITY_DN28130_c0_g2_i3* (homolog zu *cysteine/histidine-rich C1 domain protein*, *AT2G37805*, log₂FC= -11,72) wurde nach 1 d und *TRINITY_DN34187_c0_g1_i3* (homolog zu *transmembrane protein*, *AT1G31335*, log₂FC= -11,56) nach 2 d am stärksten reprimiert. Zu den weiteren stark induzierten Genen zählten beispielsweise homologe Gene zu *BCA3*, *HRE1* (*AT1G72360*), *BBX30* und *SEN1*. Weitere Beispiele für stark reprimierte Gene sind Homologe zu *RING/U-box superfamily protein* (*RING1*, *AT5G10380*), *DELTA 9 DESATURASE 1* (*ADS1*, *AT1G06080*) und *HYDROPEROXIDE LYASE 1* (*HPL1*, *AT4G15440*).

3.4.3 Kohlenhydratmangel-assoziierte Gene sind in den sensitiven Arten stärker induziert Einige der bei Überflutung stark induzierten DEGs konnten mit Kohlenhydratmangel assoziiert werden, z. B. *ASN1, SEN1* und *DIN10* (Cookson *et al.*, 2016). Deshalb wurde die Genexpression von weiteren Kohlenhydratmangel-assoziierten Genen näher betrachtet. Dazu wurden die Affymetrix-Microarray Datensätze von Usadel *et al.* (2008) und Cookson *et al.* (2016) als Grundlage verwendet, wobei 89 Gene identifiziert werden konnten, die in *A. thaliana* in beiden Arbeiten in allen getesteten Zeitpunkten stark induziert wurden und somit als Kohlenhydratmangel-Markergene dienen konnten. Um die Expression dieser Kohlenhydratmangel-Markergene in den verschiedenen Arten nebeneinander vergleichen zu können, wurden die Expressionsdaten vereint. Dazu wurden die DEGs zunächst anhand des niedrigsten BLASTN E-Values selektiert. Doppelt vorkommende DEGs wurden anhand des niedrigsten *P_{adj}* nach 1 d Überflutung gefiltert. Eine individuelle Analyse für jede Art kann dem Anhang (Daten A2) entnommen werden. Die meisten Kohlenhydratmangel-Markergene zeigten eine starke Induktion in Reaktion auf Überflutung in allen Arten (Abb. 34), beispielsweise *DORMANCY-ASSOCIATED PROTEIN-LIKE* 1 (*DYL1, AT1G28330.1*), *ASN1* (*AT3G47340.1*), *TREHALOSE-PHOSPHATASE/SYNTHASE* 9 (*TPS9, AT1G23870.1*) und *TREHALOSE-PHOSPHATASE/SYNTHASE* 11 (*TPS11, AT2G18700.1*).

A. the	aliana	C. hii	rsuta	C. pra	tensis	R. pal	ustris	R. syl	vestris		
1d	2d	1d	2d	1d	2d	1d	2d	1d	2d	AGI	
		NA	NA	NA	NA	NA	NA	X NA	NA	AT1G03090.1 AT1G06570.1	MUCA PDS1
		10.1	1473	1471	1471	1471	147 (Х	Х	AT1G08630.2	THA1
		NA	NA							AT1G10070.1	BCAT-2
			~	~	~					AT1G11260.1	STP1
х	Х	х	X	X	X	х	х	х	х	AT1G12780.1 AT1G15010.1	mediator of RNA polymerase II transcription subunit
NA	NA		Х	NA	NA	NA	NA	NA	NA	AT1G15040.1	GAT1_2.1
				Х	Х	Х	Х		Х	AT1G15380.2	GLY14
X NA	X NA	×	x			X	X	Х	X	AT1G18270.1 AT1G19530.2	ketose-bisphosphate aldolase class-ll family protein
1473	1474	~	~			~				AT1G21400.1	Thiamin diphosphate-binding fold (THDP-binding) superfamily protein
										AT1G23870.1	TPS9
	~	N1.0	NIA	X	X	NIA	NIA	NIA	NIA	AT1G28330.1	DYL1
	X	NA	NA	X	X	NA	NA	X	NA	AT1G35140.1 AT1G54740.1	PHI-1 FANTASTIC four-like protein (DUF3049)
Х	Х	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	AT1G55810.6	UKL3
NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	~		AT1G60140.5	TPS10
×	×	~	×	×	×			~		AT1G60160.1	Potassium transporter family protein Bifunctional inhibitar/linid-transfer protein/seed storage 2S albumin superfamily protein
^	^			^	X					AT1G63180.1	UGE3
	Х	Х	Х	Х	Х	Х	Х	Х	Х	AT1G64660.1	MGL
		NA	NA	NA	NA					AT1G70290.1	TPS8
		X	X	X	X	NA	NA	NA	NA	AT1G71030.1 AT1G76410.1	MYBL2 ATL8
Х	Х	X	X	NA	NA	NA	NA	NA	NA	AT1G76590.1	PLATZ transcription factor family protein
NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	AT1G77210.1	STP14
X		NA	NA		Х	NIA	N1.0		NIA	AT1G79700.2	WRI4
		×	×			NA	NA	NA	ΝA	AT1G80160.1 AT1G80440.1	KMD1
					Х			NA	NA	AT2G02710.1	PLPB
				X	X					AT2G05540.1	Glycine-rich protein family
				NA	NA	~				AT2G15890.1	MEE14
				^	^	^				AT2G15960.1 AT2G18700.1	stress-induced protein TPS11
									Х	AT2G19800.1	MIOX2
					Х					AT2G20670.1	sugar phosphate exchanger, putative (DUF506)
	v	NA	NA	NA	NA	Х	Х	NA	NA	AT2G22980.1	SCPL13
	×	NA	NA					x		AT2G25900.1 AT2G30600.2	BTB/POZ domain-containing protein
		NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	AT2G33830.1	DRM2
				Х	Х					AT2G38400.1	AGT3
										AT2G39400.1	alpha/beta-Hydrolases superfamily protein
		Х	х	х	х	X		Х	Х	AT2G40000.1 AT2G43400.1	ETEQO
Х	Х	NA	NA	NA	NA	Х	х	Х	Х	AT3G06850.2	BCE2
				Х	Х					AT3G07350.1	sulfate/thiosulfate import ATP-binding protein, putative (DUF506)
					X			v	V	AT3G10020.1	plant/protein
		NA	NA		^			^	^	AT3G15450.1	aluminum induced protein with YGL and LRDR motifs
										AT3G15630.1	plant/protein
		Х	Х	Х	X	NA	NA	NA	NA	AT3G20340.1	protein expression protein
X		Х	Х	Х	Х			NA	NA	AT3G20660.1	OCT4
			х		х					AT3G30775.1 AT3G45300.1	IVD
										AT3G47340.1	ASN1
								Х	Х	AT3G57520.1	SIP2
					X			Х	Х	AT3G61060.1	PP2-A13 Adenine nucleotide alpha hydrolasas-like superfamily protein
				X	X			х	Х	AT3G62950.1	Thioredoxin superfamily protein
Х	Х			Х	Х			Х	Х	AT4G01870.2	tolB protein-like protein
		X	Х	NA	NA	NA	NA	Х		AT4G03510.4	RMA1
		NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	A14G26260.2	MUX4 aluminum induced protein with VGL and LPDP motifs
		INA	NA							AT4G30270.1	ATH24
Х	Х		Х	Х	Х				Х	AT4G34030.1	МССВ
										AT4G34138.1	UGT73B1
										AT4G35770.1	SEN1
				NA	NA					AT4G36670.1	РМТ6
	Х				Х			Х	Х	AT4G38470.1	STY46
				Х	Х			Х		AT5G01600.1	FER1
		Х		v	×	X	X	X	X	AT5G02810.1	
	×	NA	NA	×	×	NA	NA	X	X	AT5G07440.1 AT5G08350 1	GRAM domain-containing protein / ABA-responsive protein-like protein
Х	Х	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	AT5G16340.1	AMP-dependent synthetase and ligase family protein
Х	Х	Х	Х	Х	Х			Х	Х	AT5G18170.1	GDH1
		Х	Х			NIA	NA	V	V	AT5G19120.1	Eukaryotic aspartyl protease family protein
		NA	NA			NA	NA	X	X	AT5G20230.1 AT5G20250.3	DIN10
										AT5G21170.1	AKINBETA1
							Х			AT5G22920.1	CHY-type/CTCHY-type/RING-type Zinc finger protein
					×					AT5G49360.1	BXL1
	х		х	Х	X			Х	Х	AT5G51390.1	hypothetical protein
		Х	Х	NA	NA			NA	NA	AT5G56100.1	glycine-rich protein / oleosin
	- V-	N				NA	NA			AT5G56870.1	BGAL4
~	X	X	x	x	X	NA	NA	x	x	A15G57655 1	। তানধ xvlose isomerase family protein
	~	~~~	~	~	~			~	~		Agrees issued uning protoni

Abb. 34 Expression von Kohlenhydratmangel-assoziierten Genen. Heatmap zeigt den log_2FC der Gene nach 1 d und 2 d Überflutung. Gelb repräsentiert induzierte und Cyan reprimierte Gene, Schwarz entspricht Genen, die weder induziert noch reprimiert sind (siehe log_2FC -Skala). Gene mit einem $P_{adj} > 0,05$ sind durch ein "x" gekennzeichnet. NA: nicht im Datensatz exprimiert. AGI-Gencodes selektiert nach Cookson *et al.* (2016) und Usadel *et al.* (2008).

Es konnten aber auch einige Gene identifiziert werden, die artenspezifisch reguliert wurden. Dazu gehörten z. B. *Bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein/seed storage 2S albumin superfamily protein* (*AT1G62510.1*), welches nur in den *Rorippa*-Arten signifikant reprimiert wurde sowie *GLYOXYLASE I 7* (*GLYI7, AT1G80160.1*), das ausschließlich in *C. pratensis* signifikant reprimiert wurde. Ein weiteres Beispiel ist *RING ZINC FINGER PROTEIN 34* (*RZPF34, AT5G22920.1*), welches in *R. sylvestris* signifikant reprimiert und in *A. thaliana, C. hirsuta* und *C. pratensis* signifikant induziert wurde.

Da einige der 89 Kohlenhydratmangel-Markergene nicht in allen Datensätzen exprimiert wurden (siehe Abb. 34, NA), wurde deshalb der prozentuale Anteil der signifikant induzierten Kohlenhydratmangel-Markergene ($\log_2 FC > 1$, $P_{adj} < 0,05$) für jede Art ermittelt, um so einen Vergleich zwischen den Arten zu ermöglichen (Tab. 10). Dabei konnte gezeigt werden, dass in *C. pratensis* und *R. sylvestris* etwa 50 % der Kohlenhydratmangel-Markergene signifikant induziert wurden, während die Anzahl bei *A. thaliana* und *C. hirsuta* zwischen 62 % und 76 % lag. Überraschenderweise wurden auch in *R. palustris* 69 bzw. 73 % der Kohlenhydratmangel-Markergene signifikant induziert. Um herauszufinden, ob die Induktion der Kohlenhydratmangel-Markergene mit der Zuckerverfügbarkeit korreliert, wurde die Anzahl der induzierten Kohlenhydratmangel-Markergene gegen die Zuckerkonzentrationen bei Überflutung (aus Abb. 32) aufgetragen (Abb. A7). Tatsächlich konnte so nach 1 d Überflutung gezeigt werden, dass eine höhere Zuckerkonzentration mit einer geringeren Anzahl an induzierten Kohlenhydratmangel-Markergelen gestand allerdings nicht nach 2 d Überflutung.

Tab. 10 Übersicht der induzierten Kohlenhydratmangel-Markergene. Dargestellt ist für jede Art die Anzahl sämtlicher
Kohlenhydratmangel-Markergene (gemäß Cookson et al. (2016) und Usadel et al. (2008)), die im Datensatz exprimiert wurden
(Anzahl gesamt), die Anzahl der induzierten Kohlenhydratmangel-Markergene (log ₂ FC > 1, P _{adj} < 0,05) sowie der prozentuale
Anteil der induzierten Kohlenhydratmangel-Markergene.

	A. thaliana		C. hirsuta		C. prat	tensis	R. pal	lustris	R. sylvestris		
	1d	2d	1d	2d	1d	2d	1d	2d	1d	2d	
Anzahl gesamt	85	85	71	71	71	71	71	71	73	73	
$log_2FC > 1$, $P_{adj} < 0.05$	65	62	44	44	42	33	52	49	38	40	
prozentualer Anteil	76 %	73 %	62 %	62 %	59 %	46 %	73 %	69 %	52 %	55 %	

Da jedoch nicht nur die Anzahl der signifikant induzierten Kohlenhydratmangel-Markergene, sondern auch die Expressionsstärke entscheidend sein kann, wurde ergänzend zu Abb. 34 ein Geigenplot mit allen signifikant regulierten Genen (P_{adj} < 0,05) erstellt (Abb. 35). Im Gegensatz zur Expressionsanalyse in Abb. 34 ermöglicht diese Auftragung, die Anzahl der signifikant regulierten Gene bei einem bestimmten Expressionslevel vergleichen zu können.

Abb. 35 Anzahl der Kohlenhydratmangel-Markergene in Abhängigkeit der Expressionsänderung. Geigenplot visualisiert die Expressionsänderung der Kohlenhydratmangel-Markergene (ermittelt durch Cookson *et al.* (2016) und Usadel *et al.* (2008)) bei Überflutung nach 1 d und 2 d. Die x-Achse zeigt die verschiedenen Proben und die y-Achse die \log_2 FC-Werte von sämtlichen signifikant ($P_{adj} < 0.05$) regulierten Genen. Die Breite jeder Geige entspricht der Anzahl von Transkripten bei diesem \log_2 FC. Die weiße durchgezogene Linie repräsentiert den Median und die weißen gestrichelten Linien das untere und obere Quartil. Gene, die sich im grauen Bereich (\log_2 FC -1 bis 1) befinden, sind bei Überflutung weder induziert noch reprimiert.

Einige der Kohlenhydratmangel-Markergene wurden in den *Cardamine-* und *Rorippa*-Arten weder signifikant induziert noch signifikant reprimiert, erkennbar durch die Breite der Geige im Bereich des log₂FC zwischen -1 und 1. Weiterhin konnte verdeutlicht werden, dass einige Kohlenhydratmangel-Markergene in *A. thaliana* und *C. hirsuta* stärker induziert wurden als in den anderen Arten (siehe auch Abb. 34). Dazu gehörten z. B. *THA1* (*AT1G08630.2*), *BCAT-2* (*AT1G10070.1*), *MIOX2* (*AT2G19800.1*), *KISS ME DEADLY 1* (*KMD1*, *AT1G80440.1*), *SEN1* (*AT4G35770.1*) und *DIN10* (*AT5G20250.3*). Zusammenfassend konnte auf Transkriptebene gezeigt werden, dass Überflutung einen Zustand des Kohlenhydratmangels in allen Arten hervorruft. Übereinstimmend mit dem Zuckerstatus der Pflanzen (Abb. 32) lässt die Expressionsanalyse darauf schließen, dass der Mangelzustand in den sensitiven Arten stärker ausgeprägt ist als in den toleranten Arten.

3.4.4 Überflutung im Licht ruft keine transkriptionelle Antwort auf Hypoxie hervor

Da im *N. officinale*-Datensatz die Überflutungsreaktion nicht mit O₂-Mangel in Verbindung gebracht werden konnte (Abb. 25, Abb. 26), sollte untersucht werden, ob in den anderen Arten ebenfalls kein Zusammenhang zwischen der Überflutungsantwort und der Antwort auf O₂-Mangel bestand. Als Grundlage zur Analyse diente die Expression der HRGs (Mustroph *et al.*, 2009). Dafür wurden die Expressionsdaten der verschiedenen Arten ebenfalls anhand des niedrigsten BLASTN E-Values vereint und doppelt vorkommende DEGs anhand des niedrigsten P_{adj} nach 1 d Überflutung gefiltert. Eine individuelle Analyse der Gene für jede Art kann auch hier dem Anhang (Daten A2) entnommen werden.

A. the	aliana	C. hi	rsuta	C. pra	tensis	R. pal	lustris	R. svh	/estris					
1d	2d	1d	2d	1d	2d	1d	2d	1d	2d	AGI	Annotation	-3	0	<mark>3</mark> log₂FC
X	Х	Х	Х	Х	Х	Х	Х	Х	Х	AT1G17290.1	ALAAT1			
Х	Х	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	AT1G72330.1	ALAAT2			
NA	NA			NA	NA	NA	NA	NA	NA	AT1G72330.2	ALAAT2			
NA	NA			NA	NA	NA	NA	NA	NA	AT1G72330.3	ALAAT2			
Х	Х			Х	Х					AT5G15120.1	PCO1			
NA	NA	Х	Х	NA	NA	NA	NA	NA	NA	AT5G39890.1	PCO2			
Х	Х			Х	Х	х	Х	Х	Х	AT1G77120.1	ADH1			
NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	AT4G33070.1	PDC1			
Х			Х	Х	Х	NA	NA	Х	Х	AT5G54960.1	PDC2			
Х	Х	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	AT2G34390.2	NIP2;1			
Х	Х	х		Х	Х			х	Х	AT4G32840.1	PFK6			
NA	NA	NA	NA	Х	Х	х	Х	NA	NA	AT3G43190.2	SUS4			
X	Х		X	Х		Х	Х	Х	Х	AT2G47520.1	HRE2			
Х	Х				Х				Х	AT3G02550.1	LBD41			
Х	Х	Х	Х	NA	NA	X	Х	Х	Х	AT3G10040.1	HRA1			
	Х			Х	Х				Х	AT2G16060.1	GLB1			
X	Х	Х	X	NA	NA	NA	NA	NA	NA	AT2G19590.1	ACO1			
X	Х	Х	Х	NA	NA	NA	NA	NA	NA	AT2G19590.2	ACO1			
				NA	NA	NA	NA	NA	NA	AT3G23150.1	ETR2			
Х	Х			NA	NA	NA	NA	NA	NA	AT3G23150.2	ETR2			
Х	Х	Х	Х	NA	NA	NA	NA			AT5G45340.1	CYP707A3			
NA	NA	Х	Х	Х	Х		Х	Х	Х	AT5G02200.1	FHL			
Х	Х	Х	Х	Х	Х			Х	Х	AT5G02200.2	FHL			
	Х	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	AT1G35140.1	PHI-1			
X				NA	NA			NA	NA	AT1G43800.1	SAD6			
		NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	AT1G55810.1	UKL3			
X		NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	AT1G55810.3	UKL3			
X	Х	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	AT1G55810.4	UKL3			
Х	Х	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	AT1G55810.6	UKL3			
NA	NA	Х	Х	NA	NA	NA	NA	NA	NA	AT1G55810.7	UKL3			
		NA	NA	NA	NA	NA	NA	Х		AT5G47060.1	hypothetical pr	otein		
NA	NA			X	X		Х	X	X	AT5G47060.2	hypothetical pr	otein		
				X	X	X	Х	Х	X	AT4G17670.1	senescence-as	sociated fa	amily prote	ein
		X	X	X	X	X				AT1G74940.1	putative cyclin-	dependen	t kinase	c
		X	X			X	Ň	X	X	AT1G26270.1	Phosphatidylin	ositol 3- ar	nd 4-kinas	e tamily protein
		×	×	NA	NA	×	X	X	X	AT1G63090.1	PP2-A11			
		N1.0	NLA	NIA	NLA		~	X	X	AT3G61060.1	PP2-A13			
X	X	NA	NA	NA NA	NA	X	X	NA	NA	AT504000.2	PPZ-AI3	n o rfo mili c	ratain	
X	×	×	×	NA	NA NA	X NIA	X NIA	X NIA	X NA	AT5G42200.1	TIP domain or	periarini p	rotoin	
~	~	×	~	NA	NA	NA	NA	NA	NA	ATTG72940.1		manning p	lotelli	
NA	NA	×	×	NA	NA	NΑ	ΝΔ	NA	NA	AT3G17860.2	JAZ3			
NA	NA	NA	NA	INA	NA	NA	NΔ	NA	NA	AT1G76650 1	CMI 38			
X	X	×	X	N۵	N۵	NΔ	NΔ	NΔ	NΔ	AT1G76650 3	CML38			
		X	X	_X	_X	_X	_X	×	_X	AT4G33560 1	Wound-respon	sive familu	nrotein	
x	x	X	X	X	X		X	X	X	AT4G10270 1	Wound-respon	sive family	nrotein	
X	X	X	x	NA	NA	NA	NA	NA	NA	AT5G62520 1	SR05	iaiiiiy	p. 20011	
x		X		X	X		X		X	AT5G479101	RBOHD			
X		NA	NA	X				X		AT5G58070.1	TIL			
NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	AT2G17850.1	Rhodanese			
		NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	AT4G22780.1	ACR7			
Х	Х	Х	Х	X		Х	Х	Х	Х	AT4G22780.2	ACR7			
				Х	Х	Х	Х	Х	Х	AT5G26200.1	Mitochondrial s	ubstrate ca	arrier fam	ily protein
Х		NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	AT5G44730.1	HAD superfam	ily protein		
Х	Х	NA	NA	Х	Х	Х	Х	Х	Х	AT5G44730.2	HAD superfam	ily protein		
					Х	Х	Х	Х	Х	AT5G61440.1	ACHT5			
		NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	AT5G61440.2	ACHT5			
Х	Х	Х	Х	NA	NA	NA	NA	NA	NA	AT3G27220.1	HUP6			
Х	Х	Х	Х	Х	Х				Х	AT5G10040.1	HUP9			
Х	Х			Х	Х	NA	NA	NA	NA	AT1G33055.1	HUP32			
						Х		Х	Х	AT1G19530.1	HUP36			
NA	NA	Х	Х			Х				AT1G19530.2	HUP36			
			Х	Х	Х	Х	Х	Х	Х	AT3G23170.1	HUP39			
Х	Х	Х		Х		Х	Х	Х	Х	AT4G24110.1	HUP40			
Х	Х	Х	Х	Х	Х	NA	NA	NA	NA	AT4G39675.1	HUP42			
NA	NA	NA	NA	NA	NA	Х	Х	NA	NA	AT5G66985.1	HUP44			
		NA	NA							AT4G27450.1	HUP54			

Abb. 36 Expression der Hypoxie-responsiven Gene (HRGs) bei Überflutung. Heatmap zeigt den \log_2 FC nach 1 d und 2 d Überflutung. Gelb repräsentiert induzierte und Cyan reprimierte Gene, Schwarz entspricht Genen, die weder induziert noch reprimiert sind (siehe \log_2 FC-Skala). Gene mit einem $P_{adj} > 0,05$ sind durch ein "x" gekennzeichnet. NA: nicht im Datensatz exprimiert. AGI-Gencodes wurden aus Mustroph *et al.* (2009) entnommen.

Es konnte gezeigt werden, dass im vorliegenden Datensatz nicht alle HRGs in jeder Art exprimiert wurden (Abb. 36). Auch waren von den vorhandenen homologen Transkripten nur wenige signifikant reguliert. Diejenigen Transkripte, die in den meisten Arten induziert waren, waren *Phosphatidylinositol 3- and 4-kinase family protein* (*AT1G26270.1*), *PP2-A13* (*AT3G61060.1*), *GLB1* (*AT2G16060.1*) und Gene mit unbekannter Funktion (*AT1G19530.1*, *AT1G19530.2*, *AT4G27450.1*). Transkripte, die dem *Arginin/N-Degron Pathway* zugeordnet werden können wie *ALANINE AMINOTRANSFERASE* (*ALAAT1, AT1G17290.1*), *PLANT CYSTEIN OXIDASE 2* (*PCO2, AT5G39890.1*) und *HYPOXIA RESPONSE ATTENUATOR1* (*HRA1, AT3G10040.1*) waren entweder nicht im Datensatz vorhanden oder nicht differenziell reguliert. Weitere mit dem *Arginin/N-Degron Pathway* assoziierte Transkripte wie *PCO1* (*AT5G15120.1*) und *LBD41* (*AT3G02550.1*) waren sogar reprimiert, während *HRE2* (*AT2G47520.1*) und *ALAAT2* (*AT1G72330.2, AT1G72330.3*) zumindest in den beiden *Cardamine-*Arten induziert waren.

Transkripte, die mit dem anaeroben Stoffwechsel assoziiert sind, z. B. *PYRUVATE DECARBOXYLASE-2* (*PDC2, AT5G54960.1*), *PHOSPHOFRUCTOKINASE 6* (*PFK6, AT4G32840.1*), *SUCROSE SYNTHASE 4* (*SUS4, AT3G43190.2*) und *ADH1* (*AT1G77120.1*), waren vorwiegend nicht differenziell reguliert. Ein Transkript, *STEAROYL-ACYL CARRIER PROTEIN* Δ 9-DESATURASE6 (*SAD6, AT1G43800.1*), wurde in *A. thaliana* und *C. hirsuta* reprimiert und in *R. palustris* induziert. Obwohl einige Transkripte in einigen Arten nicht in der Expressionsanalyse vorlagen, konnte dennoch in keiner Art eindeutig eine O₂-Mangel-Antwort in Reaktion auf Überflutung festgestellt werden. Wie auch bei *N. officinale* liegt bei *A. thaliana* und den *Cardamine-* und *Rorippa-*Arten vermutlich kein O₂-Mangel bei Überflutung unter Kurztagbedingungen während der Tagesphase vor.

3.4.5 GO-Analyse zur Identifizierung von überflutungsresponsiven Prozessen

Da eine Betrachtung einzelner induzierter und reprimierter Gene keinen genauen Aufschluss über die überflutungsresponsiven Prozesse gibt, wurde eine GO-Analyse durchgeführt. Die GO-Analyse bietet den Vorteil, eine Anreicherung funktioneller Kategorien für jede Art einzeln zu detektieren und die Anreicherungen von allen Arten nebeneinander vergleichen zu können. So war es möglich, artenspezifische sowie generelle überflutungsinduzierte und überflutungsreprimierte Prozesse zu identifizieren. Für die GO-Analyse wurden zunächst für die *Cardamine-* und *Rorippa*-Arten nur DEGs mit einer hohen Sequenzähnlichkeit zu *A. thaliana*-Genen (BLASTN E-Value < 1*10⁻⁶) ausgewählt, um eine präzisere Zuordnung zu den GO-Kategorien zu gewährleisten. Weiterhin wurden nicht nur die selektierten DEGs nach 1 d und 2 d, sondern auch die Schnittmenge der DEGs aus 1 d und 2 d (Abb. 37) der GO-Analyse unterzogen (Anhang Daten A4).

Abb. 37 Anzahl der differenziell exprimierten Gene (DEGs), die einer GO-Analyse unterzogen wurden. Venn-Diagramme repräsentieren die Schnittmenge von induzierten (\blacktriangle ; log₂FC > 1, *P*_{adj} < 0,05) und reprimierten (\blacktriangledown ; log₂FC < -1, *P*_{adj} < 0,05) DEGs nach 1 d und 2 d Überflutung.

Die GO-Analyse ergab eine Vielzahl an angereicherten GO-Kategorien in jeder Art (Tab. 11). Dabei lag die Anzahl der signifikant angereicherten GO-Kategorien der induzierten DEGs zu jedem Zeitpunkt höher als die Anzahl der signifikant angereicherten GO-Kategorien der reprimierten DEGs. Aufgrund der Tatsache, dass die Anzahl der signifikant angereicherten GO-Kategorien in fast allen Fällen über 100 lag, wurden nicht alle GO-Kategorien im Detail betrachtet. Vielmehr wurde zur Identifizierung von potenziellen Toleranzmechanismen der Zeitfaktor herausgenommen, indem nur noch signifikant angereicherte GO-Kategorien der Schnittmenge der DEGs nach 1 d und 2 d Überflutung (Tab. 11; P_{adj} 1d & 2d < 0,05, Abb. 37) näher betrachtet wurden. Danach war es möglich, die GO-Analysen der einzelnen Arten anhand der GO-ID zu vereinen und so die signifikant angereicherten GO-Kategorien ($P_{adj} < 0,05$) in verschiedenen Analysegruppen vergleichen zu können (Tab. 12).

Tab. 11 Anzahl der signifikant angereicherten GO-Kategorien in den untersuchten Arten. Dargestellt ist die Anzahl der GO-Kategorien aus induzierten (\blacktriangle ; log₂FC > 1, P_{adj} < 0,05) und reprimierten (\blacktriangledown ; log₂FC < -1, P_{adj} < 0,05) DEGs (siehe Abb. 37). Signifikant angereicherte GO-Kategorien wurden definiert als P_{adj} < 0,05.

GO-Kategorien	A. tha	iliana	C. hi	rsuta	C. pra	tensis	R. pal	ustris	R. sylvestris		
DEGs		▼		▼		▼		▼		▼	
$P_{adj} 1d < 0,05$	129	87	92	29	149	85	146	80	178	180	
P_{adj} 2d < 0,05	172	126	86	60	190	126	131	112	170	161	
P_{adj} 1d & 2d < 0,05	129	84	97	43	156	95	129	125	167	158	

Tab. 12 Definition verschiedener Analysegruppen, um spezifische Reaktionen auf Überflutung identifizieren zu können. Es wurde eine *Gene Ontology* (GO)-Analyse für die Schnittmenge der nach 1 d und 2 d induzierten bzw. reprimierten DEGs für jede Art separat durchgeführt. Es wurden verschiedene Analysegruppen definiert (1-4), um einen direkten Vergleich der Arten anhand der GO-IDs durchführen zu können. Die verschiedenen Analysegruppen besitzen eine unterschiedliche Kombination an signifikant überrepräsentierten ("+"; Padj < 0,05) und nicht signifikant überrepräsentierten ("-"; Padj. > 0,05) GO-IDs der Pflanzenarten.

Analysegruppe	Bezeichnung	A. thaliana	C. hirsuta	C. pratensis	R. palustris	R. sylvestris
1	allgemein	+	+	+	+	+
2	sensitiv	+	+	-	-	-
3	tolerant	-	-	+	+	+
4	Rorippa	-	-	-	+	+

Um die artenunspezifischen Reaktionen auf Überflutung charakterisieren zu können, wurden in Gruppe 1 nur GO-Kategorien ausgewählt, die gleichzeitig in allen Arten signifikant angereichert waren. In Gruppe 2 befanden sich nur GO-Kategorien, die in den sensitiven Arten *A. thaliana* und *C. hirsuta* signifikant und gleichzeitig in den toleranten Arten *C. pratensis, R. palustris* und *R. sylvestris* nicht signifikant angereichert waren. Gruppe 3 repräsentiert das umgekehrte Szenario und damit die spezifischen Reaktionen der toleranten Arten. Des Weiteren wurden *Rorippa*-spezifische Reaktionen (Gruppe 4) selektiert. Auf die Charakterisierung der *Cardamine*-spezifischen Reaktionen wurde verzichtet, da die gemeinsamen Reaktionen der sensitiven Art *C. hirsuta* und der toleranten Art *C. pratensis* bereits durch die Analyse von Gruppe 1 abgedeckt werden. Die überflutungsresponsiven Prozesse der unterschiedlichen Analysegruppen werden nun im Folgenden näher betrachtet.

3.4.6 Die allgemeine Überflutungsantwort beinhaltet Stressreaktionen

Nicht nur die Toleranzmechanismen waren von Interesse, sondern auch die generellen Reaktionen von Brassicaceae-Pflanzen auf Überflutung. Die GO-Analyse ergab für die Schnittmenge der nach 1 d und 2 d induzierten DEGs insgesamt 45 GO-Kategorien, die in allen Arten signifikant angereichert waren (Abb. 38a). Dazu gehörten biologische Prozesse assoziiert mit Kohlenhydraten ("response to sucrose", "response to fructose"), aber auch Signalwege, die mit Ethylen und ABA assoziiert sind (u. a. "response to ethylene", "ethylene-activated signaling pathway", "response to abscisic acid", "abscisic acidactivated signaling pathway"). Der Großteil der überrepräsentierten GO-Kategorien lässt allerdings auf eine stressinduzierte Schädigung des Organismus und der Aktivierung der Immunantwort hindeuten. Es waren z. B. die GO-Kategorien "response to wounding", "defense response", "MAPK cascade" und "regulation of defense response" stark angereichert. Im Speziellen waren sogar GO-Kategorien in Reaktion auf andere Organismen überrepräsentiert, z. B. "response to bacterium", "defense response to fungus", "response to insect" und "response to other organism".

		ID		Densiek
			GO-Kategorie	Bereicr
_		GO:0000165	MAPK cascade	BP
		GO.0002237	response to molecule of bacterial origin	
		GO.0002679	tespiratory purst involved in delense response	
		GO:0003700	transcription factor activity, sequence-specific DNA binding	
		GO.0005576		
		GO:0006355	regulation of transcription, DNA-templated	BP
		GO:0006612	protein targeting to memorane	BP
		GO:0006857		BP
		GO:0006865		BP
		GO:0006952	detense response	BP
		GO:0009595		BP
		GO:0009611	response to wounding	BP
		GO:0009612	response to mechanical stimulus	BP
		GO.0009617	response to bacterium	
		GO:0009625	response to insect	BP
		GO:0009627	systemic acquired resistance	BP
		GO:0009646	response to absence of light	BP
		GO:0009697	salicylic acid biosynthetic process	BP
		GO:0009723	response to ethylene	BP
		GO:0009737	response to abscisic acid	BP
		GO:0009738	abscisic acid-activated signaling pathway	BP
		GO:0009744	response to sucrose	BP
		GO:0009750	response to fructose	BP
		GO:0009753	response to Jasmonic acid	BP
		GO:0009862	systemic acquired resistance, salicylic acid mediated signaling pathway	BP
		GO:0009863	salicylic acid mediated signaling pathway	BP
		GO:0009867	jasmonic acid mediated signaling pathway	BP
		GO:0009873	ethylene-activated signaling pathway	BP
		GO:0010105	negative regulation of ethylene-activated signaling pathway	BP
		GO:0010120	camalexin biosynthetic process	BP
		GO:0010167	response to nitrate	BP
		GO:0010200	response to chitin	BP
		GO:0010310	regulation of hydrogen peroxide metabolic process	BP
		GO:0010363	regulation of plant-type hypersensitive response	BP
		GO:0015706	nitrate transport	BP
		GO:0030968	endoplasmic reticulum unfolded protein response	BP
		GO:0031347	regulation of defense response	BP
		GO:0031348	negative regulation of defense response	BP
		GO:0035556	intracellular signal transduction	BP
		GO:0042742	defense response to bacterium	BP
		GO:0043069	negative regulation of programmed cell death	BP
		GO:0043900	regulation of multi-organism process	BP
		GO:0050832	defense response to fungus	BP
		GO:0051707	response to other organism	BP
		GO:0080167	response to karrikin	BP

Abb. 38 Überrepräsentierte GO-Kategorien der allgmeinen überflutungsresponsiven Gene. Dargestellt sind nur GO-Kategorien, die gleichzeitig in allen Arten signifikant ($P_{adj} < 0,05$) angereichert waren. (a) GO-Kategorien der induzierten DEGs. (b) GO-Kategorien der reprimierten DEGs. Heatmap zeigt den negativen $\log_{10} \text{ des } P_{adj}$ (siehe Skala). BP: biologischer Prozess, MF: molekulare Funktion, CC: Zellkompartiment.

(a)

Aber auch Reaktionen auf Salicylsäure (SA) und Jasmonsäure (JA), deren Rolle zusammen mit Ethylen als primäres Signal für die Regulierung der Immunantwort bekannt sind (Pieterse *et al.*, 2009), waren in allen Arten überrepräsentiert. Dazu gehörten z. B. die GO-Kategorien "response to jasmonic acid", "salicylic acid biosynthetic process", "jasmonic acid-activated signaling pathway", "salicylic acidactivated pathway" und "systemic acquired resistance". In Reaktion auf Überflutung bzw. O₂-Mangel, Pathogenbefall und Verwundung wird der zelluläre ROS-Spiegel reguliert (Steffens *et al.*, 2013). Dementsprechend gehörten auch ROS-assoziierte GO-Kategorien ("regulation of hydrogen peroxide metabolic process", "respiratory burst involved in defense response") zu den signifikant angereicherten biologischen Prozessen der induzierten DEGs. GO-Kategorien, die mit ROS und Verwundung bzw. Immunantwort in Verbindung gebracht werden können, lassen auf eine Stressantwort in Reaktion auf Überflutung in allen Arten schließen. Außerdem waren die molekulare Funktion "transcription factor activity, sequence-specific DNA-binding" und das zelluläre Kompartiment "extracellular region" in allen Arten überrepräsentiert. Die Tatsache, dass bei Überflutung eine erhöhte Aktivität von Transkriptionsfaktoren beobachtet wurde, ist aufgrund der hohen Anzahl von DEGs und der damit einhergehenden Veränderung der Genexpression nicht überraschend.

Für die Schnittmenge der nach 1 d und 2 d reprimierten DEGs konnten insgesamt nur 4 GO-Kategorien ermittelt werden, die in allen Arten überrepräsentiert waren (Abb. 38b). Dies waren die molekulare Funktion "DNA binding" und das zelluläre Kompartiment "extracellular region", deren Anreicherung keine Rückschlüsse auf spezifische Funktionen zuließ. Außerdem waren die biologischen Prozesse "anthocyanin-containing compound biosynthetic process" und "glucosinolate biosynthetic process" in den reprimierten DEGs überrepräsentiert. Normalerweise werden Anthocyane vermehrt auf abiotischen Stress (Kovinich *et al.*, 2015) und Glucosinolate auf biotischen Stress (Hopkins *et al.*, 2009) gebildet. Eine Repression der Anthocyan- und Glucosinolat-Biosynthese kann aber auch auf eine generelle Repression von Biosyntheseprozessen hindeuten. Die Tatsache, dass nur wenige überlappende GO-Kategorien der reprimierten DEGs identifiziert werden konnten, lässt vermuten, dass reprimierte Prozesse in jeder Art individuell reguliert werden.

3.4.7 Molekulare Überflutungsmechanismen der sensitiven Arten

Zur Charakterisierung der Überflutungsmechanismen der sensitiven Arten wurden insgesamt 9 GO-Kategorien identifiziert, die spezifisch in *A. thaliana* und *C. hirsuta* überrepräsentiert waren. Bei den induzierten DEGs gehörten dazu die molekularen Funktionen "ferric-chelate reductase activity" und "auxin efflux transmembrane transporter activity" (Abb. 39a). Besonders die signifikant angereicherten biologischen Prozesse "toxin catabolic process", "response to cyclopentenone" und "defense response by callose deposition in cell wall" lassen erneut auf eine Verteidigungsantwort in den sensitiven Arten schließen. Für die reprimierten DEGs wurden die biologischen Prozesse "response to desiccation", "response to wounding" und "jasmonic acid biosynthetic process" identifiziert (Abb. 39b).

Die GO-Kategorie "ferric-chelate reductase activity" beinhaltet 8 *FRO* (*ferric reductase oxidase*)-Gene, welche an der Metallhomöostase durch Reduktion von Eisen und Kupfer beteiligt sind und durch Eisenund Kupfermangel induziert werden (Jain *et al.*, 2014). Bei näherer Betrachtung der *FRO*-Gene konnte bestätigt werden, dass insbesondere *FRO3* (*AT1G23020*) und *FRO7* (*AT5G49740*) in *A. thaliana* und *C. hirsuta* bei Überflutung stark induziert wurden, während diese in den anderen Arten entweder nicht exprimiert oder nicht signifikant differenziell reguliert wurden (Abb. A8a). Die GO-Kategorie "auxin efflux transmembrane transporter activity" beinhaltet Gene, die für Auxin-Efflux-Transporter codieren. Auch hier wurden die entsprechenden Gene der GO-Kategorie in allen Arten näher betrachtet (Abb. A8b). In *A. thaliana* und *C. hirsuta* waren insbesondere *ABCB4* (*AT2G47000*), *ABCB21* (*AT3G62150*) und *PIN7* (*AT1G23080*) in Reaktion auf Überflutung induziert. Allerdings wurde *ABCB21* (*AT3G62150.3*) auch in *R. palustris* und *R. sylvestris* stark induziert.

Abb. 39 Überrepräsentierte GO-Kategorien der sensitiven Arten. Dargestellt sind nur GO-Kategorien, die gleichzeitig in *A. thaliana* und *C. hirsuta* signifikant ($P_{adj} < 0,05$) und in den anderen Arten nicht signifikant ($P_{adj} > 0,05$) angereichert waren. (a) GO-Kategorien der induzierten DEGs. (b) GO-Kategorien der reprimierten DEGs. Heatmap zeigt den negativen \log_{10} des P_{adj} (siehe Skala). BP: biologischer Prozess, MF: molekulare Funktion, CC: Zellkompartiment.

3.4.8 Molekulare Überflutungsmechanismen der toleranten Arten

Zur Identifizierung von spezifischen Überflutungsmechanismen der toleranten Arten wurden die GO-Kategorien so gefiltert, dass nur GO-Kategorien ausgewählt wurden, die spezifisch in den toleranten Arten signifikant und gleichzeitig in den sensitiven Arten nicht signifikant angereichert waren. Dadurch konnten für die nach 1 d und 2 d Überflutung induzierten DEGs insgesamt 13 GO-Kategorien und für die reprimierten DEGs 7 GO-Kategorien identifiziert werden (Abb. 40).

ID Bereich GO-Kategorie GO:0000226 microtubule cytoskeleton organization BP GO:0006260 ΒP **DNA** replication GO:0016538 cyclin-dependent protein serine/threonine kinase regulator activity MF GO:0019252 ΒP starch biosynthetic process ΒP GO:0019760 glucosinolate metabolic process GO:0051567 histone H3-K9 methylation BΡ GO:0051726 regulation of cell cycle BP

Abb. 40 Überrepräsentierte GO-Kategorien der toleranten Arten. Dargestellt sind nur GO-Kategorien, die gleichzeitig in *C. pratensis* und den beiden *Rorippa*-Arten signifikant ($P_{adj} < 0,05$) und in den anderen Arten nicht signifikant ($P_{adj} > 0,05$) angereichert waren. (a) GO-Kategorien der induzierten DEGs. (b) GO-Kategorien der reprimierten DEGs. Heatmap zeigt den negativen log₁₀ des P_{adj} (siehe Skala). BP: biologischer Prozess, MF: molekulare Funktion, CC: Zellkompartiment.

Unter den GO-Kategorien der induzierten DEGs befanden sich beispielsweise biologische Prozesse, die mit Metallen assoziiert waren: "transition metal ion transport", "iron ion transport" und "cellular response to iron ion starvation". Außerdem befanden sich darunter Transport-assoziierte Prozesse wie "amino acid import" und "ER to Golgi vesicle-mediated transport" sowie "endocytosis". Die weiteren überrepräsentierten biologischen Prozesse "positive regulation of organ growth" und "regulation of developmental growth" sowie das Zellkompartiment "plant-type cell wall" können mit Wachstum in Verbindung gebracht werden. Letzteres war unerwartet, da zumindest *R. palustris* und *R. sylvestris* nach 2 d Überflutung ein signifikant geringeres Wachstum als unter Kontrollbedingungen aufwiesen (Abb. 7).

Zu den signifikant überrepräsentierten GO-Kategorien der induzierten DEGs zählten außerdem die molekularen Funktionen "lipid binding" und "hydrolase activity, acting on glycosyl bonds". Die GO-

Kategorie "response to anoxia" beinhaltet Transkripte, die für die GVII ERFs HRE1 und HRE2 codieren (Abb. A9). Insbesondere *HRE1* war in *R. palustris* und *R. sylvestris* nach 1 d und 2 d Überflutung stark induziert, während *HRE1* in *A. thaliana* nur nach 1 d Überflutung induziert wurde. Die signifikant angereicherten GO-Kategorien der reprimierten DEGs waren biologische Prozesse assoziiert mit Zellzyklus ("regulation of cell cylce"), DNA-Replikation ("DNA replication"), Epigenetik ("histone H3-K9 methylation") und Stoffwechsel ("starch biosynthetic process", "glucosinolate metabolic process") sowie die molekulare Funktion "cyclin-dependent protein serine/threonine kinase regulator activity". Die Anreicherung dieser Prozesse lässt eine stärkere Repression energieaufwendiger Prozesse in den toleranten Arten vermuten.

3.4.9 Rorippa-spezifische Überflutungsmechanismen

Da die untersuchten *Rorippa*-Arten extrem überflutungstolerant sind (Abb. 9d, e) und bei Überflutung weniger unter Kohlenhydratmangel zu leiden scheinen (Abb. 32, Abb. 34), wurden auch spezifische Prozesse der *Rorippa*-Arten näher betrachtet (Abb. 41). Für induzierte DEGs nach 1 d und 2 d Überflutung konnten insgesamt 13 GO-Kategorien identifiziert werden, die spezifisch nur in den *Rorippa*-Arten angereichert waren. Dazu gehörten beispielsweise Stoffwechsel-Prozesse wie "carbon utilization", "carbonate dehydratase activity", "cellular response to nitrogen starvation" und "cellular response to starvation" sowie die molekularen Funktionen "cyclic nucleotide binding", "zinc ion binding", "ammonium transmembrane transporter activity" und "organic cation transport".

Die GO-Kategorien "ammonium transmembrane transporter activity" und "organic cation transport" enthalten Gene, die für Ammoniumtransporter (AMT) codieren. In *A. thaliana* gibt es 5 Mitglieder der *AMT1*-Genfamilie und ein Gen, das für AMT2 codiert (Sohlenkamp *et al.*, 2000; von Wirén *et al.*, 2000). In allen Arten wurde *AMT1;1* bei Überflutung induziert, wobei die Induktion in den *Cardamine-* und *Rorippa-*Arten stärker war als in *A. thaliana* (Abb. A10). In den toleranten Arten wurden außerdem Transkripte induziert, die für den AMT2-Transporter codieren, der möglicherweise an der Regeneration von Ammonium während der Photorespiration beteiligt ist (Sohlenkamp *et al.*, 2002).

Für reprimierte DEGs nach 1 d und 2 d Überflutung konnten außerdem 24 GO-Kategorien identifiziert werden, die spezifisch nur in den *Rorippa*-Arten überrepräsentiert waren. Dazu gehörten Prozesse, die mit dem Zellzyklus ("regulation of G2/M transition of mitotic cell cycle", "chromosome organization", "spindle assembly") der Epigenetik ("nuclear chromatin", "histone lysine methylation", "nucleosome assembly", "nucleosome", "chromatin silencing") und Hormonen ("gibberellic acid mediated signaling pathway", "regulation of auxin polar transport", "response to cytokinin") assoziiert sind.

	0 5 -log ₁₀ (P _{adj})
ID	GO-Kategorie	Bereich
GO:0004089	carbonate dehydratase activity	MF
GO:0006464	cellular protein modification process	BP
GO:0006995	cellular response to nitrogen starvation	BP
GO:0008270	zinc ion binding	MF
GO:0008519	ammonium transmembrane transporter activity	MF
GO:0009267	cellular response to starvation	BP
GO:0009624	response to nematode	BP
GO:0010161	red light signaling pathway	BP
GO:0010260	animal organ senescence	BP
GO:0015695	organic cation transport	BP
GO:0015976	carbon utilization	BP
GO:0016844	strictosidine synthase activity	MF
GO:0030551	cyclic nucleotide binding	MF

(b)

5 -log₁₀(P_{adj})

0

	ID	GO-Kategorie	Bereich
	GO:0000786	nucleosome	CC
	GO:0000790	nuclear chromatin	CC
	GO:0001708	cell fate specification	BP
	GO:0003896	DNA primase activity	MF
	GO:0006261	DNA-dependent DNA replication	BP
	GO:0006268	DNA unwinding involved in DNA replication	BP
	GO:0006306	DNA methylation	BP
	GO:0006334	nucleosome assembly	BP
	GO:0006342	chromatin silencing	BP
	GO:0006598	polyamine catabolic process	BP
	GO:0008083	growth factor activity	MF
	GO:0008094	DNA-dependent ATPase activity	MF
	GO:0009735	response to cytokinin	BP
	GO:0009740	gibberellic acid mediated signaling pathway	BP
	GO:0009958	positive gravitropism	BP
	GO:0010389	regulation of G2/M transition of mitotic cell cycle	BP
	GO:0016458	gene silencing	BP
	GO:0016846	carbon-sulfur lyase activity	MF
	GO:0022622	root system development	BP
	GO:0034968	histone lysine methylation	BP
	GO:0042398	cellular modified amino acid biosynthetic process	BP
	GO:0051225	spindle assembly	BP
	GO:0051276	chromosome organization	BP
	GO:2000012	regulation of auxin polar transport	BP

Abb. 41 Überrepräsentierte *Rorippa*-spezifische GO-Kategorien. Dargestellt sind nur GO-Kategorien, die gleichzeitig in beiden *Rorippa*-Arten signifikant ($P_{adj} < 0,05$) und in den anderen Arten nicht signifikant ($P_{adj} > 0,05$) angereichert waren. (a) GO-Kategorien der induzierten DEGs. (b) GO-Kategorien der reprimierten DEGs. Heatmap zeigt den negativen log₁₀ des P_{adj} (siehe Skala). BP: biologischer Prozess, MF: molekulare Funktion, CC: Zellkompartiment.

3.4.10 BCA3 als Kandidatengen für Überflutungstoleranz in R. sylvestris

In den *Rorippa*-spezifischen GO-Kategorien "carbonate dehydratase activity", "carbon utilization" und "zinc ion binding" befanden sich Gene, die für CAs codieren, weshalb deren Expression bei Überflutung näher betrachtet wurde (Abb. 42, Abb. A11). Dies war von besonderem Interesse, da CAs bei aquatischen Organismen eine Rolle beim Leben unter Wasser spielen (vgl. Kapitel 1.3). In *A. thaliana* gibt es 8 α -, 6 β - und 5 γ -CA-Gene, deren Produkte in Chloroplasten, in Mitochondrien, der Plasmamembran oder dem Cytoplasma vorkommen können (Dimario *et al.*, 2017).

(a)

Annotation

ACA1

ACA1

ACA2

ACA3

ACA3

ACA4

ACA7

CA1

CA1

CA2

CA2

CA2 CA2

BCA4

BCA5 BCA6

BCA6

GAMMA CA1

GAMMA CA2

GAMMA CA3

(a) A. manana				
1d	2d	Transkript	AGI	Annotation
		AT3G52720.1	AT3G52720	ACA1
х		AT3G52720.2	AT3G52720	ACA1
		AT3G52720.4	AT3G52720	ACA1
		AT2G28210.1	AT2G28210	ACA2
		AT5G04180.1	AT5G04180	ACA3
	Х	AT3G01500.2	AT3G01500	CA1
	Х	AT5G14740.6	AT5G14740	CA2
		AT5G14740.7	AT5G14740	CA2
	Х	AT5G14740.9	AT5G14740	CA2
Х		AT1G58180.1	AT1G58180	BCA6
		AT1G58180.3	AT1G58180	BCA6
		AT1G58180.4	AT1G58180	BCA6
		AT1G58180.5	AT1G58180	BCA6
		AT1G58180.6	AT1G58180	BCA6
		AT1G58180.7	AT1G58180	BCA6
		AT1G19580.1	AT1G19580	GAMMA CA1
	Х	AT1G19580.2	AT1G19580	GAMMA CA1
		AT5G66510.1	AT5G66510	GAMMA CA3
Х		AT5G63510.1	AT5G63510	GAMMA CAL1
		AT3G48680.1	AT3G48680	GAMMA CAL2

(c) C. pratensis

(a) A thaliana

(-)	• 1	oraconolo			(•
1d	2d	Transkript	AGI	Annotation	1
Х		TRINITY_DN43684_c2_g3_i3	AT3G52720	ACA1	
		TRINITY_DN31325_c0_g1_i3	AT1G23730	BCA3	
		TRINITY_DN50656_c3_g1_i1	AT1G23730	BCA3	
		TRINITY_DN50656_c3_g1_i3	AT1G23730	BCA3	
	Х	TRINITY_DN40325_c0_g1_i2	AT1G58180	BCA6)
	Х	TRINITY_DN40325_c0_g1_i6	AT1G58180	BCA6	
Х		TRINITY_DN44418_c2_g3_i2	AT3G48680	GAMMA CAL2	

(e) R. sylvestris

1d	2d	Transkript	AGI	Annotation
х		TRINITY_DN32220_c0_g1_i8	AT3G52720	ACA1
	Х	TRINITY_DN35346_c2_g1_i3	AT3G52720	ACA1
	Х	TRINITY_DN39699_c1_g4_i2	AT3G52720	ACA1
		TRINITY_DN40404_c0_g4_i1	AT3G01500	CA1
		TRINITY_DN40404_c0_g4_i2	AT3G01500	CA1
		TRINITY_DN40404_c0_g4_i3	AT3G01500	CA1
		TRINITY_DN40404_c0_g4_i4	AT3G01500	CA1
		TRINITY_DN30558_c0_g1_i2	AT5G14740	CA2
		TRINITY_DN30558_c0_g2_i1	AT5G14740	CA2
		TRINITY_DN32185_c1_g1_i1	AT5G14740	CA2
		TRINITY_DN33852_c1_g1_i2	AT5G14740	CA2
	х	TRINITY_DN33852_c1_g1_i3	AT5G14740	CA2
		TRINITY_DN35049_c0_g1_i10	AT5G14740	CA2
		TRINITY_DN41392_c0_g1_i14	AT1G23730	BCA3
		TRINITY_DN41392_c0_g1_i7	AT1G23730	BCA3
		TRINITY_DN41392_c0_g1_i9	AT1G23730	BCA3
Х		TRINITY_DN33652_c0_g1_i2	AT4G33580	BCA5
		TRINITY_DN36079_c0_g1_i1	AT1G58180	BCA6
Х		TRINITY_DN36079_c0_g1_i2	AT1G58180	BCA6
		TRINITY_DN36079_c0_g1_i5	AT1G58180	BCA6
		TRINITY_DN36079_c0_g1_i6	AT1G58180	BCA6
		TRINITY_DN38210_c2_g1_i6	AT1G58180	BCA6

1d	2d	Transkript	AGI	Annotation
		TRINITY_DN39276_c2_g3_i1	AT3G01500	CA1
		TRINITY_DN31822_c0_g1_i1	AT5G14740	CA2
		TRINITY_DN31822_c0_g1_i11	AT5G14740	CA2
		TRINITY_DN31822_c0_g1_i12	AT5G14740	CA2
Х		TRINITY_DN31822_c0_g1_i14	AT5G14740	CA2
		TRINITY_DN31822_c0_g1_i15	AT5G14740	CA2
		TRINITY_DN31822_c0_g1_i19	AT5G14740	CA2
		TRINITY_DN31822_c0_g1_i8	AT5G14740	CA2
		TRINITY_DN34972_c0_g1_i11	AT5G14740	CA2
		TRINITY_DN34972_c0_g1_i9	AT5G14740	CA2
		TRINITY_DN34972_c0_g2_i5	AT5G14740	CA2
		TRINITY_DN34972_c0_g2_i9	AT5G14740	CA2
		TRINITY_DN38887_c0_g1_i7	AT1G23730	BCA3
Х		TRINITY_DN30963_c1_g1_i3	AT4G33580	BCA5
		TRINITY_DN32388_c0_g1_i1	AT1G58180	BCA6
		TRINITY_DN32388_c0_g1_i4	AT1G58180	BCA6
	Х	TRINITY_DN32388_c0_g1_i9	AT1G58180	BCA6
		TRINITY_DN32388_c0_g2_i1	AT1G58180	BCA6
		TRINITY_DN32388_c0_g2_i8	AT1G58180	BCA6
	Х	TRINITY_DN28648_c0_g3_i1	AT5G66510	GAMMA CA3

(b) *C. hirsuta*

Transkript

Chr7_GG_981_c1_g1_i1

Chr3_GG_551_c1_g1_i1

Chr3_GG_551_c2_g1_i1

Chr2_GG_460_c1_g1_i1

Chr2_GG_400_c0_g1_i2

Chr1_GG_191_c0_g1_i1

Chr1_GG_1585_c0_g1_i1

Chr5_GG_1154_c1_g1_i1 AT3G52720

Chr5_GG_1154_c4_g1_i1 AT3G52720

Chr4_GG_1626_c0_g1_i1 AT2G28210

Chr2_GG_1962_c1_g1_i1 AT5G04180

Chr6_GG_2389_c0_g1_i1 AT5G04180

Chr6_GG_2019_c0_g1_i1 AT5G14740

Chr6_GG_2019_c1_g1_i2 AT5G14740

Chr6 GG 2019 c3 g1 i1 AT5G14740

Chr6_GG_2019_c5_g1_i1 AT5G14740

Chr7_GG_1165_c0_g1_i1 AT4G33580 Chr2_GG_400_c0_g1_i1 AT1G58180

Chr1_GG_2200_c1_g1_i1 AT1G47260

Chr8_GG_1580_c1_g1_i1 AT5G66510

AGI

AT4G20990

AT1G08080

AT3G01500

AT3G01500

AT1G70410

AT1G58180

AT1G19580

Abb. 42 Expression von Carboanhydrase-Genen bei Überflutung. Heatmap zeigt den log_2FC nach 1 d und 2 d Überflutung in *A. thaliana* (a), *C. hirsuta* (b), *C. pratensis* (c), *R. palustris* (d) und *R. sylvestris* (e). Gelb repräsentiert induzierte und Cyan reprimierte Gene, Schwarz entspricht Genen, die weder induziert noch reprimiert sind (siehe log_2FC -Skala). Die log_2FC -Skala wurde im Vergleich zu den anderen Heatmaps geändert, um die Unterschiede zwischen den Arten hervorzuheben (siehe Abb. A11 für die gleiche log_2FC -Skala wie in den anderen Heatmaps). Gene mit einem $P_{adj} > 0,05$ sind durch ein "x" gekennzeichnet. Gezeigt sind nur Transkripte, die in mindestens einem Zeitpunkt signifikant differenziell exprimiert waren ($P_{adj} < 0,05$).

Eine Induktion von *BCA6* (*AT1G58180*) fand in allen Arten statt. In *A. thaliana* (Abb. 42a) wurde außerdem *ACA3* (*AT5G04180*) und in *C. hirsuta* (Abb. 42b) *ACA7* (*AT1G08080*) induziert. Besonders stark wurden bei Überflutung *BCA3* in *C. pratensis* (Abb. 42c) und *R. sylvestris* (Abb. 42e) sowie *CA2* (*AT5G14740*) und *BCA3* in *R. palustris* (Abb. 42d) induziert, bei denen es sich um cytosolische CAs

handelt (Fabre *et al.*, 2007). Dabei wurde *BCA3* im Vergleich zur Kontrolle bis zu 500-fach in *C. pratensis*, 15-fach in *R. palustris* und sogar mehr als 3000-fach in *R. sylvestris* induziert, während *BCA3* in *A. thaliana* und *C. hirsuta* nicht signifikant differenziell exprimiert wurde (Abb. 42,Tab. A9). Die starke Induktion von *RsBCA3* konnte außerdem mittels semiquantitativer Expressionsanalyse auch nach 7 d Überflutung bestätigt werden (Abb. 43).

Abb. 43 *RsBCA3* ist auch nach einer Woche Überflutung stark induziert. Jeweils 3 Individuen von 3-4 Wochen-alten *R. sylvestris*-Pflanzen wurden unter Kurztagbedingungen entweder komplett überflutet oder normal bewässert (Kontrolle). Nach 7 d wurden die jüngsten Blätter geerntet und das Transkriptlevel von *RsBCA3* und *TUB* als Referenz (Amplifizierung mit *A. thaliana*-spezifischen Primern) mittels semiquantitativer PCR nachgewiesen. Die Zyklenzahl betrug 30.

Aufgrund der extremen Überflutungstoleranz und der starken Geninduktion von *RsBCA3* in Reaktion auf Überflutung wurde deshalb *BCA3* als Kandidatengen für weitere Toleranzanalysen ausgewählt. Die vollständige CDS von *RsBCA3* wurde anhand des Transkriptoms identifiziert und mit der CDS von *AtBCA3* verglichen (Abb. A12), wobei viele konservierte, aber auch einige artenspezifische Bereiche identifiziert wurden. Auch in der Proteinsequenz fanden sich konservierte Bereiche, insbesondere sämtliche Aminosäuren, die an der Dimerisierung, der Zink-Ion-Bindung sowie dem aktiven Zentrum beteiligt sind (Abb. 44).

AtBCA3 RsBCA3	MSTESYEDAIKRLGELLSKKSDLGNVAAAKIKKLTDELEELDSNKLDAVERIKSGFLHFKTNNYEKNPTLYNSL MSTESYEDAIKRLGELLSKKSELGNVAAAKIKKLTDELEELDSNKLDAVERIKSGFIHFKKNNYEKNPSLYNAL ************************************
AtBCA3 RsBCA3	AKSQTPKFLVFACADSRVSPSHILNFQLGEAFIVRNIANMVPPYDKTKHSNVGAALEYPITVLNVENILVIGHS AKSQSPKFLVFACADSRVSPSHILNFQLGEAFIVRNIANMVPPFDKVKHSNVGAALEYPITVLNVENILVIGHS ****:********************************
AtBCA3 RsBCA3	CCGGIKGLMAIEDNTAPTKTEFIENWIQICAPAKNRIKQDCKDLSFEDQCTNCEKEAVNVSLGNLLSYPFVRER CCGGIKGLMAIEDDAAP-TTEFIENWIQICAPAKNRIKQECKDLSFDDQCNNCEKEAVNVSLGNLLSYPFVRER *****************
AtBCA3 RsBCA3	VVKNKLAIRGAHYDFVKGTFDLWELDFKTTPAFALS- VEKNKLTIRGAHYDFVKGTFDLWDLDYKTTPAFALS- * ****:*******************

Abb. 44 ClustalW-Sequenzalignment der Proteinsequenzen von AtBCA3 und RsBCA3. Die Proteinsequenzen wurden anhand der CDS in Abb. A12 mittels *ExPASy translate tool* erhalten. Konservierte Bereiche sind mit "*", hohe Ähnlichkeit mit ":" und schwache Ähnlichkeit mit "." gekennzeichnet, "-" entspricht dem Stopp-Codon. Unterstrichene Bereiche entsprechen dem aktiven Zentrum, fett markierte Bereiche der Dimerisierung (Polypeptid-Bindestelle) und gelb markierte Bereiche der Zink-Ion Bindestelle, basierend auf der NCBI *Conserved Domain Database* (Marchler-Bauer *et al.*, 2017).

3.4.11 BCA3 Überexpression führt zu keiner erhöhten Überflutungstoleranz in A. thaliana Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass in den toleranten Wildpflanzen aufgrund einer erhöhten Expression von CA-Genen (insbesondere BCA3) mehr CO₂ aus HCO₃ für die Unterwasser-Photosynthese bereitgestellt wird und dies womöglich zur Überflutungstoleranz beiträgt. Um den Einfluss von BCA3 auf die Überflutungstoleranz testen zu können, wurden AtBCA3- und RsBCA3-Überexpressionslinien im Col-O-Hintergrund mittels floral dip generiert und homozygote Linien der T3-Generation identifiziert. Durch Gateway-Klonierung wurden folgende Konstrukte erstellt: HA-AtBCA3 und HA-RsBCA3 (N-term. HA-Tag) sowie AtBCA3-HA und RsBCA3-HA (C-term. HA-Tag). In einer ersten Analyse konnte in den homozygoten AtBCA3- und RsBCA3-Überexpressionslinien mit C-terminalem HA-Tag, trotz eines erhöhten Transkriptlevels, kein Protein mittels Western-Blot nachgewiesen werden (Abb. A13). In einer zweiten Analyse wurden deshalb nur die homozygoten AtBCA3- und RsBCA3-Überexpressionslinien mit N-terminalem HA-Tag anhand ihrer Überexpressionsstärke auf Proteinebene mittels Western-Blot eingeordnet (Abb. 45a). Aufgrund der hohen Sequenzähnlichkeit von AtBCA3 und RsBCA3 (Abb. 44) wurde bei beiden Proteinen ein ähnliches Molekulargewicht (~ 34 kDa, inklusive HA-Tag) erwartet. Die Überexpression wurde in den Linien mit den stärksten Proteinsignalen, HA-AtBCA3 #1-6 und #10-3 sowie HA-RsBCA3 #5-11 und #9-1 außerdem auf Transkriptebene mittels semiguantitativer Transkriptanalyse bestätigt (Abb. 45b).

Abb. 45 Nachweis der Überexpression von AtBCA3 und RsBCA3 im Col-0-Hintergrund. (a) Nachweis der Proteinmenge in 7 d-alten Keimlingen mittels Western-Blot. Die Detektion (3 min Belichtungszeit) der Überexpression erfolgte mittels Anti-HA (α -HA)-Antikörper. Als Ladekontrolle dient eine Coomassie-Brillantblau (CBB)-Färbung der RuBisCO. Das erwartete Molekulargewicht liegt bei ~ 34 kDa. (b) Semiquantitative PCR zum Nachweis des Transkriptlevels aus je zwei ausgewählten Überexpressionslinien (OE-Linien) und Col-0. Der Nachweis der Überexpression erfolgte mit genspezifischen Primern (Tab. A1), *AtTUB* Expression dient als Referenz des Transkriptlevels. Die Anzahl der PCR-Zyklen war jeweils 34, "–" entspricht der Negativkontrolle mit H₂O. Die Experimente wurden von Malte Bartylla durchgeführt.

Die Überexpressionslinien HA-AtBCA3 #1-6 und #10-3 sowie HA-RsBCA3 #5-11 und #9-1 zeigten sowohl im Keimlingsstadium (Abb. 46a) als auch als adulte Pflanzen (Abb. 46b) keinen phänotypischen Unterschied zum Wildtyp Col-0. Die in Abb. 46b dargestellten Pflanzen wurden einem Überlebensexperiment nach Überflutung unterzogen, um den Einfluss der *BCA3*-Überexpression auf die Überflutungstoleranz untersuchen zu können (Abb. 47).

Abb. 46 Phänotypische Charakterisierung der *BCA3-***Überexpressionslinien im Col-0-Hintergrund.** (a) Keimlingsstadium. Pflanzen wurden für 7 d unter Langtagbedingungen angezogen. Col-0 wurde auf MS-Medium und die Überexpressionslinien (OE-Linien) zum Nachweis der Zygotie auf MS-Medium mit Hygromycin kultiviert. (b) Adulte Pflanzen, welche unter Kurztag-bedingungen angezogen wurden und in etwa das 10-Blattstadium erreicht haben. Fotos stammen von Malte Bartylla.

Abb. 47 Überexpression von *RsBCA3* und *AtBCA3* führt zu keiner erhöhten Überflutungstoleranz im Vergleich zum Wildtyp. Dargestellt ist die Überlebensrate [%] in Abhängigkeit der Überflutungsdauer [w, Wochen] von Col-0 (Wildtyp) sowie den Überexpressionslinien HA-AtBCA3 #1-6 und #10-3 sowie HA-RsBCA3 #5-11 und #9-1 aus einem Experiment. Das Überleben von jeweils 8 Pflanzen wurden nach einer Erholungszeit von 2 Wochen unter Kurztagbedingungen anhand der Fähigkeit zur Bildung neuer Blätter bestimmt (siehe Abb. A14). Daten wurden durch Malte Bartylla erhoben.

Bei einem positiven Einfluss der Überexpression von *BCA3* wurde in allen Linien ein besseres Überleben als im Wildtyp Col-0 erwartet. Es wurden je 8 Pflanzen pro Linie für 3, 3,5, 4 und 4,5 Wochen unter Kurztagbedingungen überflutet. Nach 2 Wochen Erholungszeit unter Kurztagbedingungen wurde das Überleben des Meristems anhand der Fähigkeit zur Bildung neuer Blätter bestimmt (Abb. A14). Nach 3 Wochen Überflutungsdauer überlebten bei Col-0, HA-AtBCA3 #10-3 sowie HA-RsBCA3 #5-11 und #9-1 alle Individuen, während bei HA-AtBCA3 #1-6 nur 7 von 8 Individuen überlebten (Abb. 47). Nach 3,5 Wochen überlebten nur bei HA-AtBCA3 #10-3 weiterhin alle Pflanzen, während bei Col-0 nur 87,5 % und bei den anderen Linien 75 % der Individuen überlebten. Nach 4 und 4,5 Wochen Überflutungsdauer überlebten in allen getesteten Linien nur noch 50 % der Individuen. Nach allen getesteten Zeitpunkten konnte auch kein phänotypischer Unterschied nach der Regenerationszeit beobachtet werden (Abb. A14). Aufgrund der Tatsache, dass kein wesentlicher Unterschied zwischen den Überexpressionslinien und dem Wildtyp festgestellt werden konnte, kann eine erhöhte Genexpression von *BCA3* nicht allein für eine erhöhte Überflutungstoleranz verantwortlich sein. Ein positiver Einfluss von *BCA3* auf die Überflutungstoleranz in einem komplexeren System ist jedoch weiterhin nicht auszuschließen.

3.4.12 Möglichkeiten zur Inaktivierung von RsBCA3 und anderen Carboanhydrasen

Nicht nur die Überexpression eines Gens kann einen Nachweis zur Auswirkung auf die Überflutungstoleranz liefern, sondern auch die Inaktivierung des Gens bzw. des Proteins. Eine Möglichkeit dazu wäre beispielsweise die Herstellung von *RsBCA3 knockdown*-Linien mittels RNA-Interferenz (RNAi) oder die chemische Inhibierung von CAs. Da *R. sylvestris* keine selbstbefruchtende Pflanze ist und vegetativ vermehrt wird, musste eine Transformation von Kallusgewebe zur Generation von transgenen Linien in Erwägung gezogen werden. Zur Etablierung des Transformationsprotokolls wurden mehrere Wege getestet. Der vielversprechendste Weg ist in Abb. 48 gezeigt und beruht u. a. auf den Transformationsprotokollen von *Arabidopsis halleri* (Ahmadi *et al.*, 2018) und *Oryza sativa* (Toki *et al.*, 2006). Zunächst wurden sterile Triebe (Abb. 48a) für 4 Wochen unter sterilen Bedingungen kultiviert (Abb. 48b). Die Fähigkeit zur Bildung von Kallus wurde sowohl in Wurzeln (Abb. 48c) als auch in Petiolen (Abb. 48d) und Blättern (nicht gezeigt) untersucht. In Abb. 48e ist exemplarisch die erfolgreiche Kallusinduktion aus Wurzeln gezeigt, aber auch aus Petiolen und Blättern konnte Kallusgewebe gebildet werden (nicht gezeigt). Sämtlich Test-Transformationen blieben erfolglos und werden deshalb nicht näher erläutert. Trotzdem war es möglich, aus untransformiertem Kallusgewebe mittels Regenerationsmedium Sprosse zu induzieren (Abb. 48f).

Abb. 48 Schritte der Kallusinduktion und Sprossregeneration. (a) Flüssigsterilisierte Wurzelstücke wurden auf ½ MS-Medium ausgelegt und für 10-12 d unter Langtagbedingungen kultiviert. Die entstandenen Wurzeltriebe wurden in sterilen Weckgläsern weiter kultiviert (b). Nach weiteren 4-5 Wochen unter Langtagbedingungen wurden verschiedene Gewebe, z. B. Wurzeln (c) und Petiolen (g) auf Kallusinduktionsmedium überführt. (e) Beispielhafte erfolgreiche Kallusinduktion aus Wurzeln nach 2 Wochen. (f) Überführung der Kalli auf Regenerationsmedium führt zur Sprossinduktion.

Da jedoch im Rahmen dieser Arbeit keine stabilen *RsBCA3 knockdown*-Linien generiert werden konnten, wurde als Alternative die chemische Inhibierung mittels Acetazolamid und Ethoxyzolamid in Erwägung gezogen. Acetazolamid inhibiert apoplastische CAs und Ethoxyzolamid inhibiert intrazelluläre CAs (Beer *et al.*, 2002; Horiguchi *et al.*, 2019). Die Chemikalien konnten allerdings nicht in einem Überflutungsexperiment getestet werden, da deren Halbwertszeit und Löslichkeit in Wasser sehr gering ist und so kein Einsatz in einem Langzeitexperiment möglich war. Zusammenfassend konnte der Einfluss der Inaktivierung von RsBCA3 oder weiteren CAs auf die Überflutungstoleranz nicht bestimmt werden.

4. Diskussion

4.1 Von der Natur lernen – Modell- und Wildpflanzen als Forschungsgrundlage

Aufgrund des Klimawandels ist mit einem zunehmenden Auftreten extremer Wetterereignisse zu rechnen (Hirabayashi *et al.*, 2008, 2013; Kunkel *et al.*, 2013; Alfieri *et al.*, 2018; Myhre *et al.*, 2019). Hitzewellen, Dürreperioden, starke Regenfälle und anderer Wetterextreme auf der ganzen Welt gefährden die landwirtschaftliche Produktivität (Bailey-Serres *et al.*, 2012b, 2019). Zusätzlich reichen derzeitige Ernteerträge nicht aus, um die wachsende Weltbevölkerung zu ernähren, weshalb die Entwicklung von widerstandsfähigen Pflanzen von großer Bedeutung ist (Tester & Langridge, 2010; Bailey-Serres *et al.*, 2019). Pflanzenzüchter müssen sich dabei auf ausgeprägte Merkmale mit dem größten Potenzial zur Ertragssteigerung und Verbesserung der Widerstandfähigkeit, aber auch auf die Entwicklung neuer Züchtungstechnologien konzentrieren (Tester & Langridge, 2010).

Insbesondere in den Bereichen O₂-Wahrnehmung und Überflutungstoleranz konnten mit A. thaliana als Modellorganismus einige neue Erkenntnisse erlangt werden. Beispielsweise wurde der Mechanismus der O₂-Wahrnehmung von Pflanzen sowie die Beteiligung von HRGs und weiteren Mediatoren bei Hypoxie in A. thaliana beschrieben (Mustroph et al., 2009, 2010; Gibbs et al., 2011, 2014; Licausi et al., 2011b; Weits et al., 2014). Durch die Analyse von 86 A. thaliana-Ökotypen konnte außerdem eine natürliche Variation in der Überflutungstoleranz entdeckt werden (Vashisht et al., 2011). Einblicke in die molekularen Mechanismen der Überflutungstoleranz konnten, u.a. durch den molekularen Vergleich von 8 A. thaliana-Ökotypen (van Veen et al., 2016) und einer quantitative trait locus (QTL)-Analyse (Akman et al., 2017) erhalten werden. Letztere identifizierte potenzielle Kandidatengene für Überflutungstoleranz innerhalb des Come Quick Drowning1 (CQD1)-Locus (Akman et al., 2017). Dazu gehörten u.a. ATERF-2 (AT5G47220), RESPIRATORY BURST OXIDASE PROTEIN D (RBOHD, AT5G47910) und TREHALOSE-6-PHOSPHATE PHOSPHATASE A (AT5G51460). Bei all den Vorteilen von A. thaliana als Modellorganismus ergibt sich jedoch ein wesentlicher Nachteil, nämlich die Tatsache, dass A. thaliana natürlicherweise nicht in überflutungsgefährdeten Gebieten vorkommt. Deshalb ist es unvermeidlich, die Analysen auf Nicht-Modellorganismen bzw. Wildpflanzen auszuweiten, um so spezifische überflutungstolerante Reaktionen und Merkmale aufklären zu können.

Erst kürzlich konnten durch die Analyse von vier Angiospermen (Reis, *Medicago truncatula* und zwei *Solanum*-Spezies) aus Feucht- und Trockengebieten insgesamt 68 Genfamilien (*submergence up-regulated families*, SURFs) identifiziert werden, die in allen Pflanzenarten bei Überflutung induziert wurden (Reynoso *et al.*, 2019). Im Vergleich zu den anderen Arten wies Reis einen höheren Anteil an induzierten Genen pro SURF auf, und auch die Häufigkeit spezifischer Transkriptionsfaktor-Bindestellen sowie das Ausmaß der Chromatin-Zugänglichkeit in den SURFs wurde in Reis verstärkt beobachtet

(Reynoso *et al.*, 2019). Dies deutet darauf hin, dass grundlegende regulatorische Netzwerke zwar scheinbar in mehreren Pflanzenfamilien verankert sind, die Entstehung überflutungsanpassungsfähiger Merkmale aber von der Entwicklung in einem selektiven Umfeld, z. B. Feuchtgebiete oder überflutungsgefährdete Gebiete, abhängt.

Insbesondere im Nassreisanbau wird die Fähigkeit einiger Reissorten ausgenutzt, unter natürlichen Bedingungen in feuchten und warmen Gebieten zu wachsen. Durch den Vergleich verschiedener Reiskultivare war es möglich, die GVII ERFs SUB1A und SNORKEL1/2 als Mediatoren der *Quiescence*- bzw. *Escape*-Strategie und deren Einfluss auf die Überflutungstoleranz von Reis identifizieren zu können (Xu *et al.*, 2006; Hattori *et al.*, 2009). Die molekulare Charakterisierung des SUB1-Locus ermöglichte es, überflutungstolerante Hochleistungssorten (z. B. Swarna-Sub1) durch Präzisionszucht (*marker-assisted breeding / smart breeding*) zu erzeugen (Septiningsih *et al.*, 2009). Ein Vergleich der Reissorten Swarna-Sub1 und der Elternsorte Swarna ergab, dass das Einbringen von *SUB1* unter normalen Wachstumsbedingungen keinen negativen Einfluss auf den Phänotyp, den Ertrag und die Kornqualität hat (Singh *et al.*, 2009). Während Überflutung in den sensitiven Sorten zu einem dramatischen Rückgang des Ertrags (u.a. durch Verzögerung der Blüte, verringerte Anzahl der Blütenrispen) führt, zeigten Sub1-Sorten nicht nur ein verbessertes Überleben nach mehr als 14 d, sondern wesentlich höhere Ausbeuten und eine bessere Kornqualität als die elterlichen Genotypen (Singh *et al.*, 2009). In den Jahren 2009 und 2010 wurden Sub1-Sorten (u.a. Swarna-Sub1) offiziell für den kommerziellen Anbau in Indien, Indonesien, Bangladesch und auf den Philippinen freigegeben (Bailey-Serres *et al.*, 2010).

Trotz intensiver Forschung konnten noch keine weiteren stressresistenten Sorten bei anderen Kulturpflanzen, z. B. Sojabohne (*Glycine max*), Raps (*Brassica napus*), Kartoffel (*Solanum tuberosum*) und Zuckerrübe (*Beta vulgaris*) entwickelt werden (Mustroph, 2018a). Im Gegensatz zu Reis handelt es sich bei diesen genannten Nutzpflanzen um dikotyle Pflanzen, was die Erforschung von Überflutungstoleranzmechanismen in anderen dikotylen Pflanzen erfordert. Es gibt bereits zahlreiche Studien zur Analyse der Überflutungstoleranz in zwei *Rumex*-Arten (van Veen *et al.*, 2013). Der Mangel an transgenen Pflanzen führte jedoch dazu, dass sich *Ru. palustris* nicht als dikotyles Modellpflanzensystem etablieren konnte. Auch außerhalb der Hypoxie- und Überflutungsforschung konnten mithilfe von Modell- und Nicht-Modellpflanzen neue Mechanismen aufgeklärt werden, wobei idealerweise nahe verwandte Arten verglichen wurden, aber auch oft *A. thaliana* als Vergleich hinzugezogen wurde. Dazu gehörte z. B. die Analyse der Schattenvermeidungsreaktion (*shade avoidance syndrome*) in zwei *Geranium*-Arten (Gommers *et al.*, 2017), die Analyse der Blattformdiversität in *C. hirsuta* (Canales *et al.*, 2010) und die Metallhyperakkumulation in *Arabidopsis halleri* (Weber *et al.*, 2004, 2006). Innerhalb der Brassicaceae-Familie wurden Überflutungstoleranz und Überlebensstrategien bereits in *R. amphibia* und *R. sylvestris* untersucht (Akman *et al.*, 2012). In dieser Arbeit wurden deshalb verschiedene Brassicaceae-Wildpflanzen ausgewählt, deren Lebensstil an überflutungsgefährdete Gebiete angepasst ist. Diese Arten stellen somit potenzielle Kandidaten für die Etablierung eines dikotylen, überflutungstoleranten und genetisch zugänglichen Modellorganismus dar.

4.2 Analyse überflutungsresponsiver Mechanismen durch RNA-seq

Während in der Vergangenheit Microarray-Analysen für Transkriptomvergleiche in Modellpflanzen herangezogen wurden, eröffnete die Etablierung von *Next Generation Sequencing*-Technologien faszinierende Möglichkeiten zur Analyse von Pflanzen mit und ohne sequenziertem Genom (Bräutigam & Gowik, 2010). Die vergleichende Transkriptomanalyse mit *Next Generation Sequencing* ermöglicht dabei nicht nur den Vergleich innerhalb einer Spezies, sondern auch den Vergleich mehrerer Nicht-Modellspezies. Letzteres kann dabei durch die Zuordnung der Reads zu einem gemeinsamen oder zu individuellen Referenztranskriptomen erfolgen. In dieser Arbeit wurden bereits publizierte Genome bzw. Transkriptome herangezogen und auch neue Referenztranskriptome mit der Trinity-Methode (Grabherr *et al.*, 2011) erstellt. Eine Zuordnung der Reads von allen Arten gegen das *A. thaliana*-Transkriptom wurde nicht durchgeführt, da die untersuchten Arten eine unterschiedliche Ploidie aufweisen. Während *A. thaliana* und *C. hirsuta* diploid sind, sind *N. officinale* und die beiden *Rorippa*-Arten tetraploid, und *C. pratensis*-Individuen zeigten Unterschiede in der Chromosomenanzahl. Folglich kann ein Gen aus *A thaliana* in mehreren Kopien in den Genomen von *C. pratensis*, *N. officinale* und den *Rorippa*-Arten vorliegen, wodurch eine Zuordnung zum *A. thaliana*-Transkriptom zu einer ungenauen Anzahl an DEGs sowie einer fehlerhaften Expressionsanalyse führen kann.

Weiterhin zeigte eine phylogenetische Analyse, dass die *Cardamine-, Nasturtium-* und *Rorippa-*Arten näher zueinander verwandt sind als zu *A. thaliana* (Abb. 6a). Durch Mapping der Reads gegen individuelle Transkriptome konnten somit sämtliche differenziell regulierten Transkripte identifiziert werden und nicht nur Transkripte, die im *A. thaliana*-Transkriptom vorhanden sind. Um deren Funktion und Beteiligung an spezifischen Prozessen identifizieren zu können, wurden die Transkripte dennoch mittels BLASTN-Analyse anhand ihrer Sequenzähnlichkeit *A. thaliana*-Transkripten zugeordnet. Obwohl Transkripte, die nur eine geringe oder keine Sequenzähnlichkeit zu *A. thaliana* aufwiesen, nicht näher betrachtet wurden, bietet die vorliegende Arbeit dennoch eine Grundlage zur Identifizierung überflutungsresponsiver Mechanismen innerhalb der Brassicaceae-Familie – insbesondere der molekularen Charakterisierung der gegensätzlichen Wachstumsreaktionen in *N. officinale* und der Überflutungstoleranz in einem Multispezies-Vergleich der Rosettenpflanzen.

4.3 Gegensätzliche Wachstumsstrategien bei N. officinale

4.3.1 Gewebeunspezifische Reaktionen sind mit Stoffwechseländerungen assoziiert

Überflutung von *N. officinale*-Pflanzen führte zu gewebespezifischen Wachstumsreaktionen: verstärktes Stängelwachstum und unterdrücktes Petiolenwachstum (Abb. 10). Dies bot die Gelegenheit, gegensätzliche Wachstumsreaktionen bei Überflutung innerhalb einer Pflanzenart zu untersuchen. Trotz starker kontrastierender Wachstumsreaktionen ergab eine genomweite Transkriptomanalyse nur wenige qualitative gewebespezifische Unterschiede. Dafür konnte eine starke Überlappung der Transkriptänderungen zwischen Stängeln und Petiolen festgestellt werden. Diese überlappenden Überflutungstranskripte zeigen allgemeine überflutungsinduzierte Mechanismen, die wahrscheinlich unabhängig von der Wachstumsregulation agieren. Überflutung entzieht den Pflanzen essenzielle Kohlenhydrate (Bailey-Serres & Voesenek, 2008). Dementsprechend konnte in beiden Geweben ein Kohlenhydrate (Bailey-Serres & Voesenek, 2008). Dementsprechend konnte in beiden Geweben ein Kohlenhydraten zu öberflutung festgestellt werden (Abb. 11). Dies spiegelte sich auch in der ähnlichen Expression von Kohlenstoffmangel-Markergenen wie *MIOX2* oder *BCAT-2* (Schuster & Binder, 2005; Osuna *et al.*, 2007) wider, welche auch verstärkt bei einer verlängerten Nacht exprimiert werden (Usadel *et al.*, 2008). Diese Reaktion stimmt mit Beobachtungen in *A. thaliana* überein, dass durch Überflutung induzierte Transkriptionsänderungen denen eines Hungerzustandes ähneln (Lee *et al.*, 2011; van Veen *et al.*, 2016).

Neben Glykolyse und Gärung nutzen Pflanzen auch alternative Mechanismen, um diese Energiekrise zu bewältigen, z. B. die Verwendung von anorganischen Pyrophosphat (PP_i)-abhängigen Enzymen (Bailey-Serres & Voesenek, 2008; Bailey-Serres et al., 2012a). Das PPi-verwendende Enzym PPDK und das Gluconeogeneseenzym PEPCK wurden bei Überflutung in N. officinale stark induziert. Deren glukoneogene Rolle bei der Vermittlung von Überflutungstoleranz wurde bereits in Reis, Ru. acetosa, R. sylvestris und A. thaliana-Ökotypen diskutiert (Moons et al., 1998; Sasidharan et al., 2013; van Veen et al., 2013, 2016). Darüber hinaus könnte die Fermentation durch eine höhere Verfügbarkeit von Pyruvat gesteigert werden. Dies kann beispielsweise durch die gleichzeitige Reduktion der Biosynthese von verzweigtkettigen Aminosäuren (branched-chain amino acids, BCAAs; Valin, Leucin, Isoleucin) und der Induktion des BCAA-Katabolismus erreicht werden, da Pyruvat das Ausgangssubstrat für die BCAA-Biosynthese ist (Binder, 2010). Tatsächlich führte eine Inhibierung der BCAA-Biosynthese in Pisum sativum nicht nur zu einer Akkumulation von Pyruvat, sondern auch zu einer Steigerung der PDC-, ADH-, LDH- und AlaAT-Enzymaktivitäten (Gaston et al., 2002). In N. officinale wurden Gene, die am BCAA-Metabolismus beteiligt sind, z. B. IPMI, IMD und BCAT (Binder, 2010), bei Überflutung stark reguliert. Zusammenfassend führt Überflutung in N. officinale zu gewebeunabhängigen Anpassungen des Stoffwechsels, bei denen Biosyntheseprozesse angehalten und alternative Kohlenstoffressourcen mobilisiert werden.

4.3.2 Transkriptionelle Regulation der Wachstumsunterdrückung in den Petiolen

Die Transkriptomanalyse ergab eine höhere Anzahl von DEGs in den Petiolen und damit einhergehend mehr Transkripte in den Petiolen-spezifischen Clustern (Abb. 12, Abb. 13). Dies impliziert, dass bei Überflutung die Wachstumsunterdrückung in den Petiolen transkriptionell stärker reguliert wird als die Wachstumsförderung in den Stängeln. Interessanterweise wurden Prozesse, die an der Translation, der Zellproliferation und dem Zellzyklus beteiligt sind, in den Petiolen stärker reprimiert als in den Stängeln (Abb. 15, Abb. 16). *WOX4*, was nur in den Petiolen herunterreguliert war, fördert die vaskuläre Zellteilung und *A. thaliana wox4* RNAi-Mutanten zeigten einen Zwergphänotyp (Ji *et al.*, 2010).

Bislang wurde die Rolle der negativen Regulation der Zellteilung bei der Wachstumshemmung bei Überflutung (z. B. bei der *Quiescence*-Strategie) noch nicht intensiv untersucht. SUB1A reprimiert Gene, die für die Zellelongation in Reis verantwortlich sind (Fukao *et al.*, 2006), und Ethylen kann bei Umweltstress einen Stillstand des Zellzyklus hervorrufen (Skirycz *et al.*, 2011). Da jedoch weder Ethylen noch ACC das Wachstum der Petiolen negativ beeinflussten (Abb. 22), ist es unwahrscheinlich, dass Ethylen den möglichen Stillstand des Zellzyklus in *N. officinale* auslöst. Andere Faktoren wie der Zuckeroder Energiestatus, Lichtsignale oder eine Änderung des Redoxstatus könnten diese Reaktion verursachen und zu einer Änderung der Kalziumsignaturen oder einer Phosphorylierungs- / Dephosphorylierungsreaktion führen und so die Genexpression verändern. Dementsprechend weist *NAD(P)binding Rossmann-fold superfamily protein*, welches in Petiolen induziert und in Stängeln reprimiert wurde, eine hohe Sequenzähnlichkeit zu *Pisum sativum* Tic32, einem möglichen Redoxsensor, auf (Hörmann *et al.*, 2004; Tonfack *et al.*, 2011). Weiterhin werden CDKs / Cyclin-Komplexe bei Stress durch CDK-Inhibitor-Proteine reprimiert, z. B. *ICK1* (Wang *et al.*, 2000; Vandepoele *et al.*, 2002). Da *ICK1* signifikant in den Petiolen induziert wurde, liegt die Vermutung nahe, dass Überflutung einen regulierten Stillstand des Zellzyklus in den Petiolen von *N. officinale* auslöst.

Unter den in den Petiolen stärker induzierten Genen war *HSFA4A*. Hitzestress-Transkriptionsfaktoren (HSFs) spielen eine entscheidende Rolle bei der Reaktion von Pflanzen auf Hitze oder anderen Stress, indem sie die Expression stressresponsiver Gene wie Hitzeschockproteine (HSPs) regulieren (Guo *et al.*, 2016). In *A. thaliana* wurden hitzestressresponsive Gene bei Anoxie induziert und eine Überexpression von *AtHSFA2* führte zu einer erhöhten Toleranz gegenüber Anoxie und Überflutung (Loreti *et al.*, 2005; Banti *et al.*, 2010). Eine Induktion von *AtHSFA4A* und weiteren HSFs konnte auch nach 2 h Hypoxie-Behandlung beobachtet werden (Lee & Bailey-Serres, 2019). Obwohl Überflutung in der Regel nicht mit hohen Temperaturen einhergeht, kann die Akkumulation von HSFs und HSPs einen Schutz gegen Zellschädigung unter extremen Stressbedingungen wie Hypoxie und Wiederbelüftung darstellen (Pérez-Salamó *et al.*, 2014; Lee & Bailey-Serres, 2019). Eine Überexpression von *AtHSFA4A*

Wildtyp (Pérez-Salamó *et al.*, 2014). Ein gleichzeitiges Auftreten von erhöhter HSF-Expression und einem Zwergphänotyp konnte auch in weiteren Studien beobachtet werden (Sakuma *et al.*, 2006; Ogawa *et al.*, 2007; Yoshida *et al.*, 2008). Insofern wäre es möglich, dass HSFs an der Wachstums-repression in den Petiolen von *N. officinale* beteiligt sind.

4.3.3 ABA-Abbau ist der entscheidende Faktor für das Stängelwachstum unter Wasser

In *N. officinale* führte die überflutungsinduzierte Expression von ABA-Abbaugenen zu einer raschen Abnahme der ABA-Konzentration in beiden Geweben (Abb. 18, Abb. 19). Der durch Überflutung bedingte ABA-Abbau ist der entscheidende Faktor, welcher Elongation in vielen Arten fördert. Beispielsweise löste Überflutung einen ABA-Abbau bei der elongierenden Art *Ru. palustris* aus, nicht jedoch bei der quiescenten Art *Ru. acetosa* (Benschop *et al.*, 2005). Zusätzlich wurde die Unterwasser-Elongationsrate der Petiole bei *Ru. palustris*-Ökotypen durch die natürliche Variation der endogenen ABA-Konzentration bestimmt (Chen *et al.*, 2010). Auch die durch Überflutung verursachte Elongation der Internodien von Tiefwasserreis erfordert den Abbau von ABA durch 8'-Hydroxylierung (Hoffmann-Benning & Kende, 1992; Saika *et al.*, 2007). Interessanterweise verstärkte ein künstlich hervorgerufener ABA-Abbau die Elongation der Petiolen bei *Ru. acetosa* (Benschop *et al.*, 2005). Im Gegensatz dazu führte der ABA-Abbau nicht zu einer verstärkten Elongation aus, da ein rascher ABA-Abbau bei Überflutung auch in nicht-elongierendem Reis berichtet wurde (Ram *et al.*, 2002; Fukao & Bailey-Serres, 2008; Hattori *et al.*, 2009).

Exogenes ABA im Überflutungswasser wirkte sich nicht auf die Wachstumsreaktion der Petiole aus, aber eine zunehmende ABA-Konzentration verringerte die Elongation des Stängels in einer dosisabhängigen Weise drastisch (Abb. 19). Darüber hinaus verringerte die Hemmung der ABA 8'-Hydroxylierung durch Abz-E3M die Elongation unter Wasser, jedoch wurde dabei nicht das Wachstumsniveau der Kontrollpflanzen erreicht (Abb. 19). Obwohl die 8'-Hydroxylierung als der Hauptweg des ABA-Abbaus angesehen wird, kann ABA auch durch Konjugation zu ABA-Glucosylester über Uridindiphosphat-Glycosyltransferasen (z. B. UGT71B6-B8, UGT71C5) inaktiviert werden (Kushiro *et al.*, 2004; Dong *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2015). Interessanterweise findet der ABA-Abbau statt, bevor die ABA-Abbaugene *NoCYP707A1* und *NoCYP707A2* ihr Expressionsmaximum erreicht haben. Es ist deshalb wahrscheinlich, dass der anfängliche ABA-Abbau durch andere ABA-Abbauprozesse als die 8'-Hydroxylierung hervorgerufen wird. Die Tatsache, dass Elongation auch auf die Aktivität alternativer ABA-Abbauprozesse zurückzuführen sein kann, wurde bereits in *Ru. palustris* vermutet (Benschop *et* *al.*, 2005). Um einen genaueren Einblick in den ABA-Abbau bei *N. officinale* zu erhalten, ist es demnach wichtig, zukünftig die Expression alternativer ABA-Abbaugene zu betrachten.

4.3.4 Das Unterwasser-Stängelwachstum ist nicht hauptsächlich durch Ethylen induziert Ethylen ist dafür bekannt, die sogenannte *triple response* auszulösen: gehemmtes Sprosswachstum, verstärktes Dickenwachstum und horizontales (diagravitropes) Wachstum, wodurch Ethylen zunächst als Phytohormon der Wachstumsinhibierung galt (Guzmán & Ecker, 1990; Pierik *et al.*, 2006). Die wachstumsstimulierende Wirkung von Ethylen wurde später in einer Reihe semi-aquatischer Pflanzen entdeckt (Jackson, 1985; Voesenek & van der Veen, 1994; Voesenek *et al.*, 1997; Kende *et al.*, 1998). Interessanterweise akkumulierten sowohl *Ru. palustris* als auch *Ru. acetosa* innerhalb von 24 h nach Überflutung hohe Konzentrationen von Ethylen (Voesenek *et al.*, 1993). Allerdings führte Ethylen in *Ru. palustris* zur Wachstumsförderung und in *Ru. acetosa* zur Wachstumsinhibierung bei Überflutung (Voesenek *et al.*, 1997). Die Applikation von Ethylen stimulierte die Elongation in Tiefwasserreis und *Ru. palustris* ähnlich oder sogar doppelt so stark wie Überflutung (Kende *et al.*, 1998; Cox *et al.*, 2006). Ethylen beschleunigte außerdem die Elongation in Stecklingen von *N. officinale*, was jedoch nur für neu entstehende Seitentriebe und nicht für Internodien nachgewiesen wurde (Schwegler & Brändle, 1991).

In dieser Arbeit konnte bei *N. officinale* eine 3-fache Wachstumszunahme bei Überflutung, aber nur eine 1,5-fache Zunahme durch Ethylen- oder ACC-Behandlung beobachtet werden. Zusätzlich wurde die Elongation des Stängels nur teilweise durch die Inhibierung der Ethylen-Signaltransduktion oder der -Biosynthese verringert, was bedeutet, dass die Unterwasser-Elongation nicht vollständig auf Ethylen zurückgeführt werden kann (Abb. 22). Insgesamt deuten die Ergebnisse auf eine Regulation durch andere Überflutungssignale als Ethylen hin. Während der durch Überflutung verursachte ABA-Abbau in *Ru. palustris* und Reis mit der Akkumulation von Ethylen zusammenhängt (Benschop *et al.*, 2005; Saika *et al.*, 2007), wird der ABA-Abbau in *N. officinale* wahrscheinlich nicht durch Ethylen vermittelt, da die Behandlung mit ACC weder die Genexpression von *NoNCED3* noch von *NoCYP707A1* oder *NoCYP707A2* veränderte (Abb. 20). Eine ähnliche Beobachtung wurde in *Solanum dulcamara* gemacht, wo ein reduzierter ABA-Gehalt für die überflutungsinduzierte Bildung von Adventivwurzeln notwendig ist (Dawood *et al.*, 2016). Die durch Überflutung induzierte Induktion der Gene, die für ABA 8'-Hydroxylasen codieren, konnte jedoch nicht durch eine Ethylen-Behandlung nachgeahmt werden (Dawood *et al.*, 2016). Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass alternative ABA-Abbauwege durch Ethylen reguliert werden.
4.3.5 Das überflutungsinduzierte Stängelwachstum wird nicht durch GA vermittelt

Ein reduzierter ABA-Spiegel führte bei Tiefwasserreis und *Ru. palustris* zu einer GA-vermittelten Elongation durch eine Erhöhung der GA-Biosynthese oder GA-Sensitivität (Hoffmann-Benning & Kende, 1992; Benschop *et al.*, 2006). Eine zeitabhängige Expressionsanalyse von GA-Biosynthese- und Inaktivierungsgenen zeigte eine signifikante Induktion von *OsGa20ox2* im elongierenden Reiskultivar C9285 und nicht in T65, einem nicht elongierenden Reiskultivar (Minami *et al.*, 2018). Zusätzlich wurde *OsGa3ox2* nur geringfügig in C9285 induziert, aber nicht in T65, und die Expressionsmuster von *OsGa2ox*-Genen waren zwischen den Genotypen überwiegend vergleichbar (Minami *et al.*, 2018). In *Ru. palustris* nahm die Expression von *RpGa20ox1* in Reaktion auf Überflutung zunächst innerhalb von 4 h ab, stieg danach aber wieder an und war nach 24 h Überflutung stärker als unter Kontrollbedingungen (Benschop *et al.*, 2006). Die Expression von *RpGA3ox1* stieg direkt nach Überflutung stark an und hatte einen Anstieg im GA₁-Spiegel zur Folge. Sowohl die *RpGa3ox1*-Expression als auch der GA₁-Spiegel blieben im weiteren Verlauf im Vergleich zu Kontrollpflanzen erhöht. Auch die Expression von *RpGA2ox1* nahm zu Beginn der Überflutung stark zu, nach etwa 6 h aber wieder ab (Benschop *et al.*, 2006).

In N. officinale konnte nur eine schwache Induktion von NoGa2ox2 in den Stängeln und eine signifikante Induktion in den Petiolen festgestellt werden (Abb. 23, Abb. 24). Außerdem führte Überflutung zu einer signifikanten Repression von NoGa3ox1 und einer Induktion von NoGa2ox2 in beiden Geweben (Abb. 23, Abb. 24). Die Expressionsmuster ließen deshalb vermuten, dass in N. officinale nur inaktive GAs und keine aktiven GAs bei Überflutung akkumulieren. Die Veränderungen in der Expression von RpGA200x1 und RpGA20x1 deuteten eigentlich auch nicht auf eine erhöhte GA-Biosynthese in Ru. palustris hin (Benschop et al., 2006). In Ru. palustris wurde vermutet, dass dies die Folge einer negativen Rückkopplung sein könnte, was bei N. officinale auch nicht auszuschließen ist, aber nur durch die Bestimmung der Konzentrationen von aktiven und inaktiven GAs aufgeklärt werden kann. Allerdings spielt GA vermutlich keine Rolle in der Unterwasser-Elongation von N. officinale, denn es reichte nicht aus, die Pflanzen mit dem GA-Biosyntheseinhibitor PAC zu behandeln, um die Elongation des Stängels zu hemmen (Abb. 24b, c). In Ru. palustris führte die Behandlung mit PAC zur Hemmung der Elongation und die Zugabe von GA3 oder GA4 wirkte dem entgegen (Rijnders et al., 1997; Benschop et al., 2006). Im Gegensatz dazu konnte in N. officinale-Stängeln kein signifikanter Unterschied in der Unterwasser-Elongation zwischen Überflutung mit und ohne GA₃ festgestellt werden (Abb. 24c). Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass die Unterwasser-Elongation des Stängels eine Abnahme der ABA-Konzentration erfordert, die Elongation jedoch letztendlich nicht durch GA vermittelt wird.

4.3.6 Die Unterwasser-Elongation wird vermutlich durch circadiane Rhythmik gesteuert Die Unterwasser-Elongation des Stängels kann in eine frühe Phase, die den ABA-Abbau einleitet, und eine späte Phase unterteilt werden, in der nachts ein verstärktes Wachstum auftritt (Abb. 25a). Es wurde zunächst vermutet, dass dieses schnelle Wachstum durch einen Hypoxie-Zustand induziert werden könnte, der durch Überflutung in Dunkelheit hervorgerufen wird. Diese Idee wurde durch zahlreiche Berichte über Hypoxie als Auslöser von Elongation bei vielen Arten und unter verschiedenen Bedingungen gestützt (Métraux & Kende, 1984; Summers & Jackson, 1994; Voesenek *et al.*, 1997; Sasayama *et al.*, 2018). Tatsächlich wurden die HRGs *NoADH1*, *NoLBD41* und *NoGLB1* nur in der Nacht sehr stark induziert, als auch der O₂-Partialdruck in beiden Geweben von *N. officinale* signifikant abnahm (Abb. 25b, c, e). Eine Induktion von Transkripten, die mit Glykolyse, Fermentation und Hypoxie assoziiert sind, fand in Reis auch hauptsächlich bei Überflutung in der Nacht statt und wurde durch die Entfernung des Gasfilms sogar noch verstärkt (Mori *et al.*, 2019).

In den Geweben von *N. officinale* stieg die interne O₂-Konzentration durch den Wechsel von Überflutung in Dunkelheit zu Überflutung im Licht auf etwa 22-24 kPa an (Abb. 25b, c). Diese hyperoxischen Bedingungen sind das Resultat der O₂-Produktion durch die Unterwasser-Photosynthese und der langsamen Diffusionsrate von O₂ von der Pflanze in die Umwelt (Pedersen *et al.*, 2006; Mori *et al.*, 2019). Eine Abnahme der internen O₂-Konzentration in Dunkelheit und einer Zunahme der internen O₂-Konzentration im Licht ist ein weit verbreitetes Phänomen bei überfluteten Pflanzen (Rijnders *et al.*, 2000; Colmer & Pedersen, 2008b; Lee *et al.*, 2011; Vashisht *et al.*, 2011; Mori *et al.*, 2019). In *A. thaliana* konnte beispielsweise gezeigt werden, dass der O₂-Partialdruck in der Wurzel innerhalb weniger Stunden nach Überflutung in Dunkelheit von 5 kPa auf weniger als 0,1 kPa und im Spross von 16,5 kPa auf 7,4 kPa sank und der Wechsel zu Überflutung im Licht den O₂-Partialdruck im Spross innerhalb von Minuten wieder auf 16,5 kPa als Folge der Unterwasser-Photosynthese herstellte (Lee *et al.*, 2011). Auch in Tiefwasserreis sank der O₂-Partialdruck in den Internodien bei kompletter Überflutung in Dunkelheit auf 3-5 kPa und stieg bei nachfolgender Überflutung im Licht auf etwa 30 kPa an (Mori *et al.*, 2019).

Die Tatsache, dass die Elongation unter Wasser bei kontinuierlichem Licht nicht beeinträchtigt wurde, zeigt allerdings, dass die Elongation der Stängel keine hypoxischen Bedingungen erfordert. Rhythmische Wachstumsmuster sind in der Natur allgegenwärtig und werden häufig der circadianen Uhr zugeschrieben, insbesondere wenn sie unter kontinuierlichen Lichtbedingungen aufrechterhalten werden (Farré, 2012; Dornbusch *et al.*, 2014). Es wird daher vermutet, dass das verstärkte Unterwasser-Wachstum in der Nacht ein gewisses Maß an Beeinflussung durch circadiane Rhythmen erfordert. Die Elongation in *Chenopodium rubrum* ist circadian reguliert (Lecharny *et al.*, 1985) und die Elongation der Petiolen in überfluteten *Ru. palustris* Pflanzen folgte ebenfalls einem rhythmischen

97

Wachstumsmuster (Vreeburg *et al.*, 2005). Es wäre interessant zu testen, ob die Stängel von *N. officinale* das Wachstumsverhalten durch Akklimatisierung an konstantes Licht vor der Überflutung oder durch weitere Manipulation der Licht- oder Tageszyklen verändern.

4.3.7 Auxin und BRs sind nicht eindeutig an den Wachstumsreaktionen beteiligt

Ein niedriger ABA-Gehalt scheint als Voraussetzung für die Unterwasser-Elongation bei amphibischen Arten nahezu allgegenwärtig zu sein. Die Abnahme des ABA-Spiegels ist häufig mit einem wachstumsstimulierenden Hormon gekoppelt, meistens mit GA (Benschop *et al.*, 2006; Hattori *et al.*, 2009), aber auch mit Auxin, wie bei *Hydrocharis morsus-ranae*, *Regnellidium diphyllum*, *Ranunculus sceleratus* und *Ru. palustris* (Cookson & Osborne, 1978; Horton & Samarakoon, 1982; Cox *et al.*, 2004, 2006). Umgekehrt wurde eine Rolle von BRs bei der Vermittlung von SUB1A-regulierter Wachstumsunterdrückung in Reis identifiziert (Schmitz *et al.*, 2013). Kürzlich konnte auch ein Zusammenhang zwischen JA und der überflutungsinduzierten Elongation in Tiefwasserreis festgestellt werden (Minami *et al.*, 2018). GO-Kategorien assoziiert mit JA befanden sich in keinem der untersuchten Cluster unter den am stärksten angereicherten GO-Kategorien. Deshalb wird kein bedeutender Einfluss von JA auf die gegensätzlichen Wachstumsreaktionen in *N. officinale* bei Überflutung vermutet. Allerdings konnten Reaktionen auf Auxin und BRs bei Überflutung in *N. officinale* detektiert werden (Fig. 2d).

Obwohl diese GO-Kategorien im gewebeunspezifischen Cluster 3 überrepräsentiert waren, wurde die Beteiligung von Auxin und BRs an den gegensätzlichen Wachstumsreaktionen dennoch untersucht. Die Expression von BR-Biosynthesegenen und BR-Abbaugenen zeigte keinen Unterschied zwischen Stängeln und Petiolen (Abb. 27). Die Inhibierung der BR-Biosynthese durch BRZ führte zu einem Zwergphänotyp, die gegensätzlichen Wachstumsreaktionen unter Wasser blieben jedoch unbeeinflusst (Abb. 28). Eine Beteiligung von BRs an den gewebespezifischen Reaktionen bei Überflutung ist somit unwahrscheinlich.

Der Einfluss von Auxin wurde in dieser Arbeit mittels Expressionsdaten der Gene des Hauptbiosynthesewegs sowie durch Inhibierung des Auxin-Effluxes untersucht. Während *NoTAA1* eine Repression in Stängeln und Petiolen zeigte, war die Expression von *NoYUC8* bei Überflutung nur in den Petiolen signifikant erhöht, wobei das relative mRNA-Level aber gering war (Abb. 29, Abb. 30). Deshalb wurde keine erhöhte Biosynthese durch den Tryptophan-IPA-Biosyntheseweg vermutet. Jedoch kann Auxin auch noch über einen Tryptophan-unabhängigen Weg synthetisiert werden, welcher im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht wurde. Weiterhin konnte durch die Behandlung mit NPA, einem Auxin-Efflux-Inhibitor, keine eindeutige Schlussfolgerung gezogen werden. Das relative Wachstum der Stängel bei Überflutung in NPA-behandelten Pflanzen war zwar geringer als in mock-behandelten

98

Pflanzen, der Unterschied war aber nicht signifikant (Abb. 30c). Im Gegensatz dazu führte die Zugabe von 2,4-D zum Überflutungswasser zu einer verstärkten Elongation der Stängel in NPA-behandelten Pflanzen. Die Wirkung von 2,4-D ist jedoch unabhängig vom Auxin-Efflux, da 2,4-D zwar ein Substrat der Auxin-Influx-Carrier, aber nicht der Auxin-Efflux-Carrier ist (Delbarre *et al.*, 1996).

Die Wirkung von Auxin basiert hauptsächlich auf der Säurewachstumstheorie (*acid-growth theory*), welche von Hager *et al.* (1971) beschrieben wurde: Auxin führt zur Aktivierung membrangebundener H⁺-ATPasen. Die Abgabe von Protonen verursacht eine Ansäuerung der Zellwand, wodurch die Aktivität von zellwandmodifizierenden Enzymen erhöht wird. Tatsächlich sind spezifische zellwand-modifizierende Enzymen häufig an der Unterwasser-Elongation beteiligt, die Genexpression ist dabei jedoch nicht immer von Auxin abhängig, sondern kann auch durch Ethylen, GA oder O₂ beeinflusst werden (Cho & Kende, 1997; Kim *et al.*, 2000; Vriezen *et al.*, 2000; Ookawara *et al.*, 2005; Minami *et al.*, 2018). In *N. officinale* war die Genexpression von EXPs, XTHs und PMEs in Reaktion auf Überflutung in beiden Geweben ähnlich (Abb. 14). Auch in Reiskoleoptilen wurde keine Korrelation zwischen der Expression von EXPs und Elongation beobachtet (Magneschi *et al.*, 2009). Allerdings ist die Aktivität von zellwandmodifizierenden Enzymen abhängig vom pH-Wert (Cosgrove, 2000; Micheli, 2001). Dementsprechend könnten die gegensätzlichen Wachstumsreaktionen auch auf Proteinebene reguliert werden oder eine gewebespezifische apoplastische Ansäuerung erfordern, wie es in *Nymphoides peltata, Potamogeton distinctus* und *Ru. palustris* der Fall ist (Malone & Ridge, 1983; Vreeburg *et al.*, 2005; Koizumi *et al.*, 2011).

4.3.8 Welche anderen Faktoren könnten die Wachstumsreaktionen beeinflussen?

Die obigen Aspekte betreffen die eher späten Reaktionen, die die Unterwasser-Elongation vermitteln. Es ist jedoch weiterhin unklar, welches Signal den ABA-Spiegel in *N. officinale* senkt. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit legen nahe, dass die Hauptsignale der Überflutungsantwort, Ethylen und O₂ (Sasidharan *et al.*, 2018), nicht oder nur in sehr begrenztem Umfang beteiligt sind. Auch die überflutungsinduzierte Elongation in *Echinochloa oryzoides* konnte nicht durch Behandlung mit Hypoxie oder Ethylen nachgeahmt werden (Pearce & Jackson, 1991). Interessanterweise elongieren einige Spezies (z. B. Tiefwasserreis und *Lotus tenuis*) bereits dann, wenn sie nur teilweise überflutet sind (Hattori *et al.*, 2009; Manzur *et al.*, 2009). Die teilweise Überflutung dieser Arten führt wahrscheinlich zu einer verringerten Akkumulation von Ethylen und keinem erheblichen Hypoxie-Zustand, was die Existenz zusätzlicher spezifischer Sensormechanismen bei Überflutung impliziert. Dementsprechend wurde die Elongation in *Regnellidium diphyllum* und *Nymphoides peltata* nur stimuliert, wenn bei der Ethylen-Behandlung zusätzliche Gewichte an den Pflanzen angebracht wurden, um die Auftriebskraft unter Wasser zu imitieren (Musgrave & Walters, 1974; Ridge & Amarasinghe, 1984). Es ist dennoch nicht vollständig auszuschließen, dass Ethylen die Expression von Genen, die für Uridindiphosphat-Glycosyltransferasen codieren, reguliert und so doch für das Einsetzten des ABA-Abbaus direkt nach Überflutung verantwortlich ist, im weiteren Verlauf aber nicht mehr an der Fortsetzung der Wachs-tumsantwort (vor allem in der Nacht) beteiligt ist.

Überflutung führt nicht nur zu einer raschen Akkumulation von Ethylen, sondern beeinflusst auch die Abundanz von O₂, CO₂, ROS und NO (Bailey-Serres & Voesenek, 2008). Studien berichten, dass die durch Ethylen induzierte Bildung von Adventivwurzeln und Aerenchymen in Reis vom ROS-Signal abhängt (Steffens et al., 2011, 2012). Überflutung im Licht kann zu einer erhöhten ROS-Produktion in den Peroxisomen führen (Mommer & Visser, 2005; del Río & López-Huertas, 2016). Obwohl die NO-Dynamik bei Überflutung im Licht noch relativ unbekannt ist, ist die Rolle als Signalmolekül – abhängig oder unabhängig von ROS – in Reaktion auf Hypoxie, mechanischen Stress und Verwundung bereits gut untersucht (Garcês et al., 2001; Planchet et al., 2005; Farnese et al., 2016). In N. officinale wurden einige Gene, die mit Verwundung assoziiert werden, in Reaktion auf Überflutung induziert (Abb. 13), welche die Bildung und Anreicherung von NO fördern könnten. Der NO-Scavenger GLB1 (Gupta et al., 2011) wurde insbesondere in der Nacht stark induziert (Abb. 25e). Die Beteiligung von NO an der Bildung von Adventivwurzeln wurde in Suaeda salsa bei Staunässe nachgewiesen (Chen et al., 2016). Zusätzlich gibt es Hinweise auf eine Wechselwirkung zwischen ROS (z. B. H₂O₂), NO und ABA-Signalwegen. Beispielsweise wirken H₂O₂ und NO der ABA-Hemmung der Samenkeimung entgegen, indem sie die Expression von CYP707A-Genen induzieren (Liu et al., 2009, 2010). Die Beteiligung von ROS und/oder NO an der durch Überflutung verursachten Abnahme der ABA-Konzentration ist zum jetzigen Zeitpunkt jedoch reine Spekulation.

4.4 Multispezies-Vergleich zur Identifizierung von Toleranzmechanismen

Während *N. officinale* als einzige Spezies eine *Escape*-Strategie bei Überflutung annahm, zeigten alle untersuchten Rosettenpflanzen eine *Quiescence*-Strategie (Abb. 7). Zur Identifizierung von Toleranzmechanismen der Rosettenpflanzen wurden die Reaktionen bei Überflutung auf physiologischer und metabolischer Ebene beschrieben und die Änderungen der Genexpression in den Blättern von im Licht überfluteten Pflanzen mittels RNA-seq in einem Multispezies-Vergleich analysiert.

Die molekulare Analyse von *R. amphibia* und *R. sylvestris* umfasste bisher nur die Analyse von Wurzeln, unter der Verwendung des Arabidopsis ATH1-Microarrays (Sasidharan *et al.*, 2013). Wurzeln tragen jedoch nur einen Teil zur Überflutungsantwort bei, wie es beispielsweise durch Pfropfungsexperimente in *A. thaliana*-Ökotypen gezeigt werden konnte (Yeung *et al.*, 2018). Die höhere Überflutungstoleranz des *A. thaliana*-Ökotyps Lp2-6 wurde nicht negativ durch das Pfropfen des Lp2-6-Sprosses auf die Wurzel des sensitiven Ökotyps Bay-0 beeinflusst, und umgekehrt führte das Pfropfen des Bay-0-Sprosses auf die Lp2-6-Wurzel zu keiner erhöhten Toleranz (Yeung *et al.*, 2018). Das könnte darauf zurückzuführen sein, dass Wurzeln oft schon in gut durchlässigen Böden mit O₂-Mangel (O₂-Partialdruck 5 kPa) konfrontiert sind (Lee *et al.*, 2011). Wurzeln sind bereits unter Kontrollbedingungen stets in Dunkelheit und besitzen keine photosynthetische Aktivität, im Gegensatz zu Blättern.

Blätter können deshalb bei Überflutung im Licht einen entscheidenden Beitrag zum Überleben bei Überflutung leisten (Blom *et al.*, 1994; Mommer & Visser, 2005; Vashisht *et al.*, 2011; Winkel *et al.*, 2013). Weiterhin sind auch die kontrastierenden Überlebensstrategien – *Escape* und Qiescence – überwiegend auf das Sprossverhalten zurückzuführen. Bisher wurden die Reaktionen von *A. thaliana*-Blättern auf Überflutung nur in Dunkelheit untersucht (Lee *et al.*, 2011; van Veen *et al.*, 2016; Yeung *et al.*, 2018). In der Natur geht Überflutung allerdings nicht immer mit völliger Dunkelheit einher, sondern Lichtquantität und Lichtqualität sind abhängig von der Wassertrübung und der Wassertiefe (Vervuren *et al.*, 2003). Überflutung ist ein komplexer Stress, bei dem die Pflanze mit unterschiedlichen Stressfaktoren konfrontiert wird: O₂-Mangel, Kohlenhydratmangel, Trockenstress, oxidativer Stress, Toxizität und Anfälligkeit für Pathogenbefall (Colmer & Voesenek, 2009; Tamang & Fukao, 2015; Fukao *et al.*, 2019; Yeung *et al.*, 2019). Der Zusammenhang zwischen abiotischen und biotischen Stressfaktoren bei Überflutung und deren Einfluss auf die Überflutungstoleranz der untersuchten Brassicaceen wird in den nächsten Abschnitten näher betrachtet.

4.4.1 Zusammenhang zwischen Primärstoffwechsel und Überflutungstoleranz

Obwohl die untersuchten Rosettenpflanzen alle eine *Quiescence*-Strategie aufwiesen, konnten dennoch deutliche Unterschiede in der Überflutungstoleranz (Abb. 9) sowie in der ADH-Aktivität (Abb. 31) und in der Zuckerverfügbarkeit (Abb. 32) festgestellt werden. Die sensitiven Arten *A. thaliana* und *C. hirsuta* überlebten nur 3 bzw. 6 Wochen Überflutung, zeigten keine erhöhte ADH-Aktivität bei Überflutung und die Zuckerverfügbarkeit lag lediglich bei etwa 25 % im Vergleich zur Kontrolle. *C. pratensiss*-Individuen überlebten 10 Wochen Überflutung, zeigten eine erhöhte ADH-Aktivität bei Überflutung und eine höhere Zuckerverfügbarkeit bei Kontrollbedingungen im Vergleich zu *A. thaliana*, *C. hirsuta* und *R. palustris*. Allerdings führte Überflutung in *C. pratensis* zu einem rapiden Abfall der Zuckerkonzentrationen auf nur 25 % im Vergleich zu Kontrollbedingungen. Im Gegensatz dazu lag die Zuckerkonzentration bei *R. palustris* unter Kontrollbedingungen zwar niedriger als bei *C. pratensis* und *R. sylvestris*, dafür blieben nach 2 d Überflutung etwa 75 % der Zucker erhalten. *R. palustris* zeigte ebenfalls eine starke Induktion der ADH-Aktivität bei Überflutung und überlebte 10 Wochen Überflutung vollständig. Die Überlebensrate von *R. sylvestris*-Individuen nach 10 Wochen Überflutung war ebenfalls bei 100 %, die ADH-Aktivität war bei Überflutung höher als bei Kontrollbedingungen und die Pflanzen konnten bei Überflutung mehr als 50 % der Zucker bewahren. Interessanterweise zeigte *R. sylvestris* sogar einen geringeren Kohlenhydratverlust bei Überflutung in Dunkelheit als in Dunkelheit an der Luft (van Veen *et al.*, 2014). Aus diesen Daten konnten folgende Schlussfolgerungen gezogen werden: Erstens gab es keine Korrelation zwischen der Zuckerverfügbarkeit unter Kontrollbedingungen, die der Ausgangslage zu Beginn des Überflutungsexperiments entspricht, und der Überflutungstoleranz (siehe *R. palustris*). Zweitens war eine geringe Zuckerverfügbarkeit bei Überflutung nicht mit einer geringen Toleranz verbunden (siehe *C. pratensis*). Drittens könnte die Induktion von Gärungsprozessen einen positiven Einfluss auf die Überflutungstoleranz haben (siehe *C. pratensis* und *Rorippa*-Arten).

In Reis wurden höheren Mengen an Kohlenhydraten vor und nach Überflutung mit erhöhter Überflutungstoleranz in Verbindung gebracht (Singh et al., 2001; Fukao & Bailey-Serres, 2008; Yeung et al., 2019). Dennoch korreliert eine anfänglich hohe Kohlenhydratverfügbarkeit nicht immer mit erhöhter Toleranz, denn Ru. acetosa hatte zwar vor Überflutung eine höhere Kohlenhydratkonzentration als Ru. palustris, ist aber trotzdem sensitiver als Ru. palustris (van Veen et al., 2014). In verschiedenen A. thaliana-Ökotypen korrelierte die initiale Kohlenhydrat- und Stärkekonzentration ebenfalls nicht mit der Überflutungstoleranz (Vashisht et al., 2011). Eine Mutation im PRT6-Gen, wie es in der prt6und der greening after extended darkness 1 (ged1)-Mutante der Fall ist, führte zu einer erhöhten Überflutungstoleranz aufgrund eines verringerten Abbaus von Stärkereserven im Vergleich zu den entsprechenden Wildtypen (Riber et al., 2015). Die Verfügbarkeit von Stärke ist ein entscheidender Faktor für die Überflutungstoleranz, denn die Unfähigkeit, Stärke zu synthetisieren oder zu verwenden, wirkt sich negativ auf das Überleben bei Überflutung aus (Loreti *et al.*, 2018). Da das zu untersuchende Pflanzenmaterial zu Beginn der Lichtperiode geerntet wurde, wurde die Stärke-Konzentration nicht bestimmt, da selbst Kontrollpflanzen durch den Verbrauch der Stärke über Nacht nur geringe Konzentrationen aufweisen würden. Dennoch wäre es interessant, die Stärke-Gehalte in einer zeitabhängigen Analyse zu untersuchen, um herauszufinden, ob die toleranten Arten insbesondere am Ende des Tages auf eine höhere Stärkeverfügbarkeit als die sensitiven Arten zurückgreifen können.

Bisher existieren kontroverse Ergebnisse, ob die Induktion der ethanolischen Gärung einen positiven Einfluss auf die Toleranz gegenüber Hypoxie / Überflutung hat oder nicht. Auf der einen Seite konnte in einigen Studien in den toleranten Arten eine höhere ADH-Aktivität bei O₂-Mangel / Überflutung als in den sensitiven Arten festgestellt werden (Gibbs *et al.*, 2000; Fukao *et al.*, 2006; Mustroph *et al.*, 2006). Auch *SUB1A*-Genotypen zeigten eine stärkere Induktion von PDC- und ADH-Aktivitäten bei Überflutung als Genotypen ohne SUB1A (Fukao et al., 2006). Auf der anderen Seite führte eine Überexpression von ADH1 in A. thaliana zu keiner erhöhten Toleranz (Ismond et al., 2003). Die Tatsache, dass adh1-Mutanten ein stark verringertes Überleben bei Hypoxie aufwiesen (Ismond et al., 2003), bekräftigt jedoch wieder den positiven Einfluss der ethanolischen Gärung auf die Stresstoleranz.

Pflanzen leiden bei Überflutung unter Energie- und Kohlenhydratmangel aufgrund der Einschränkung von Photosynthese und aerober Atmung. Pflanzen haben einen ähnlichen Energiestatus, wenn sie über einen längeren Zeitraum Dunkelheit ausgesetzt sind, wodurch einige Transkripte co-reguliert werden (Lee *et al.*, 2011). Es wurden einige Hungerstress-Markergene bei Überflutung in allen Arten induziert. Dazu gehörten z. B. *ASN1* (auch *DARK INDUCIBLE 6, DIN6*), *TPS9* und *TPS11*. Die Expression von *DIN*-Genen bei Überflutung in Dunkelheit konnte bereits in *A. thaliana* und *Rumex* beobachtet werden (Lee *et al.*, 2011; van Veen *et al.*, 2013). Interessanterweise ist *DIN6* ein direktes Target des SnRK1-Komplexes, welcher als Sensor für den Kohlenhydrat- bzw. Energiestatus der Pflanze fungiert (Baena-González *et al.*, 2007). SnRK1 erfasst den Energiestatus der Pflanze wahrscheinlich durch energiereiche Zuckerphosphate, insbesondere Trehalose-6-Phosphat, dessen Konzentration bei einem positiven Energiestatus hoch ist und bei Überflutung sinkt (Cho *et al.*, 2016, 2019). Es wird vermutet, dass SnRK1 bei einem niedrigen Energiestatus in den Kern wandert und dort Gene aktiviert, die größtenteils an Abbauwegen und der Initiierung von Autophagie beteiligt sind, wodurch alternative Energiequellen und Metaboliten zur Verfügung gestellt werden (Baena-González *et al.*, 2007; Cho *et al.*, 2019; Ramon *et al.*, 2019).

Bei Überflutung konnten auch einige Gene identifiziert werden, die in *A. thaliana* bzw. *C. hirsuta* stärker induziert waren als in den toleranten Arten, z. B. andere *DARK INDUCIBLE (DIN)*-Gene wie *SEN1* oder *DIN10* sowie *THA1*. Die Expression von *THA1*, was für die Threonin-Aldolase (katalysiert den Abbau von Threonin zu Glycin und Acetaldehyd) codiert, war ebenfalls bei Überflutung in *Ru. acetosa*, aber nicht in *Ru. palustris* induziert (van Veen *et al.*, 2013). Zusammenfassend deuten die Ergebnisse der molekularen und physiologischen Analyse darauf hin, dass Überflutung in allen Brassicaceen einen Kohlenhydratmangel auslöst, allerdings von unterschiedlicher Stärke (Abb. 32, Abb. 34, Abb. 35). Die Unterschiede im Primärstoffwechsel scheinen im direkten Zusammenhang mit der Überflutungs-toleranz zu stehen.

4.4.2 Reaktionen auf biotischen Stress sind unabhängig von der Überflutungstoleranz Überflutung kann die Wahrscheinlichkeit einer Pathogeninfektion erhöhen, da eine hohe Luftfeuchtigkeit und starker Regen die Zunahme von Pathogenen und die Übertragung von Krankheiten begünstigen (Fujita *et al.*, 2006; Tamang & Fukao, 2015; Velásquez *et al.*, 2018). Pflanzen werden bei Überflutung mit Bodenpathogenen konfrontiert, die aus der Erde freigesetzt wurden (Lee *et al.*, 2011), aber auch während der Regenerationsphase besteht ein hohes Infektionsrisiko. Eine Studie von Hsu *et al.* (2013) hat gezeigt, dass Pflanzen Abwehrreaktionen aktivieren, um sich vor einer möglichen Infektion während oder nach der Überflutung schützen zu können. Dabei wurden Gene der Immunantwort und WRKY-Transkriptionsfaktoren bei Überflutung stark induziert und die Pflanzen waren nach der Überflutung resistenter gegenüber dem bakteriellen Pathogen *Pseudomonas syringae* (Hsu *et al.*, 2013). WRKY-Transkriptionsfaktoren sind an verschiedenen pflanzlichen Prozessen beteiligt, vor allem an der Regulation der Genexpression bei abiotischem und biotischem Stress und spielen so eine wichtige Rolle bei der Immunantwort (Pandey & Somssich, 2009). Die Expression von WRKY-Transkriptionsfaktoren in Reaktion auf Überflutung und O₂-Mangel konnte in einigen Studien bei unterschiedlichen Arten nachgewiesen werden (Hsu *et al.*, 2011, 2013; Sasidharan *et al.*, 2013; Fukushima *et al.*, 2016). Die Tatsache, dass sehr viele Gene, die mit der Pathogenabwehr assoziiert sind, auch bei Überflutung induziert werden, deutet darauf hin, dass die Signalwege von Überflutungs-stress und Pathogenabwehr gleichzeitig aktiv sein können (Lee *et al.*, 2011).

Überflutung führte auch in A. thaliana, C. hirsuta, C. pratensis, R. palustris und R. sylvestris zu einer Induktion von Reaktionen auf biotischen Stress. Dazu gehörten u.a. die GO-Kategorien "response to wounding", "defense response", "response to bacterium", "defense response to fungus", "response to chitin" und "respiratory burst involved in defense response" (Abb. 38), deren Anreicherung schon in *A. thaliana*-Ökotypen bei Überflutung in Dunkelheit nachgewiesen werden konnten (van Veen *et al.,* 2016; Yeung et al., 2018). Vicente et al. (2019) konnten außerdem einen Zusammenhang zwischen dem Arginin/N-Degron Pathway und der pflanzlichen Immunantwort feststellen. Beispielsweise wird die Biosynthese von Camalexin, dem Hauptphytoalexin in A. thaliana (Glawischnig, 2007), durch Komponenten des Arginin/N-Degron Pathways reguliert (Vicente et al., 2019). Phytoalexine sind antimikrobielle Verbindungen, die unmittelbar nach einer Infektion oder bei Stress gebildet werden und so zur Resistenz von Pflanzen gegen durch Pilze und Bakterien verursachte Krankheiten beitragen (Kuc, 1995). Camalexin spielt dabei u. a. eine positive Rolle bei der Resistenz gegenüber nekrotrophen Pilzen (Thomma et al., 1999; Ferrari et al., 2003). Auch in den hier untersuchten Arten wurde der biologische Prozess "camalexin biosynthetic process" bei Überflutung induziert (Abb. 38), was ein weiteren Hinweis auf die Überlagerung von abiotischen und biotischen Stresssignalen darstellt. Bei der Überlagerung von abiotischen und biotischen Stresssignalen spielen außerdem durch ABA, SA, JA und Ethylen regulierte Signalwege eine Schlüsselrolle (Fujita et al., 2006), welche in den Brassicaceen ebenfalls in Reaktion auf Überflutung induziert wurden (Abb. 38). Allerdings befanden sich Reaktionen auf biotischen Stress und Aktivierung der Immunantwort unter den generellen Reaktionen auf Überflutung, weshalb diese vermutlich nicht für die Unterschiede in der Überflutungstoleranz verantwortlich sind.

4.4.3 Einfluss von Trockenstress und Metallstress auf die Überflutungstoleranz

Obwohl Überflutungsstress und Trockenstress zwei gegensätzliche Stressfaktoren sind – zu viel Wasser vs. zu wenig Wasser – kann Überflutungsstress dennoch mit Trockenstress einhergehen. Das ist beispielsweise dann der Fall, wenn die entstehende Hypoxie im Boden (Lee et al., 2011; Vashisht et al., 2011) die Funktionalität der Wurzel und damit die Wasseraufnahme beeinträchtigt. Infolge der verminderten Wasseraufnahmefähigkeit der Wurzel zeigt der Spross oft Trockenstress-ähnliche Symptome in der Regenerationsphase, z. B. eingerollte und ausgetrocknete Blätter (Setter et al., 2010; Aroca et al., 2012; Yeung et al., 2018, 2019). In der vorliegenden Arbeit zeigten die sensitiven Arten A. thaliana und C. hirsuta ein stärkeres Austrocknen bzw. Absterben der Blätter nach der Regenerationsphase als die toleranten Arten (Abb. 9, Abb. A3). Ein starkes Austrocknen der Blätter wurde bereits im A. thaliana-Ökotyp Bay-0 und der Reissorte IR42 mit Intoleranz gegenüber Überflutung in Verbindung gebracht (Setter et al., 2010; Yeung et al., 2018). Im Gegensatz dazu zeigten SUB1A-Genotypen ein weniger starkes Austrocknen der Blätter und sogar eine erhöhte Toleranz gegenüber Trockenheit (Fukao et al., 2011). Intoleranz gegenüber Überflutung hängt u. a. mit der Unfähigkeit zur Schließung der Stomata direkt nach Überflutung und der späten Wiederöffnung der Stomata in der Regenerationsphase zusammen. Die schnelle Schließung der Stomata direkt nach Überflutung wirkt zwar dem Wasserverlust durch Transpiration entgegen, führt aber auch zu einer begrenzten CO₂-Aufnahme für die Photosynthese. Die Schließung der Stomata im toleranten A. thaliana-Ökotyp Lp2-6 erfolgte schneller als im sensitiven A. thaliana-Ökotyp Bay-0 (Yeung et al., 2018). Interessanterweise zeigte die GO-Analyse der reprimierten DEGs nach 1 d und 2 d Überflutung eine Anreicherung der GO-Kategorie "response to desiccation" in den sensitiven Arten A. thaliana und C. hirsuta. Ob dies einen Einfluss auf die Überflutungstoleranz hat, ist allerdings unklar, da die Repression des Prozesses "response to desiccation" auch schon bei Überflutung in der Spezies Solanum dulcamara, welche nasse Standorte bevorzugt, beobachtet werden konnte (Dawood et al., 2014; Nguyen et al., 2016).

Die GO-Analyse der induzierten DEGs identifizierte bei *A. thaliana* und *C. hirsuta* die GO-Kategorien "ferric-chelate reductase activity" und "toxin catabolic process" als sensitiv-spezifische Reaktionen bei Überflutung (Abb. 39a). Beide GO-Kategorien waren bei Überflutung auch in *Ru. acetosa*, aber nicht in *Ru. palustris* angereichert (van Veen *et al.*, 2013). Innerhalb der GO-Kategorie "ferric-chelate reductase activity" befinden sich *FRO*-Gene, welche durch Eisen- und Kupfermangel induziert werden (Jain *et al.*, 2014). Bei Überflutung im Licht waren insbesondere *FRO3* und *FRO7* in den sensitiven Arten *A. thaliana* und *C. hirsuta* stark induziert (Abb. A8a). Beim Vergleich der molekularen Reaktionen von *A. thaliana*-Ökotypen auf Überflutung in Dunkelheit wurden *FRO4*, *FRO5* und weitere Gene für Eisen- bzw. Metalltransporter als Kandidatengene für Überflutungstoleranz eingeordnet, da diese eine stärkere Repression in den Wurzeln der toleranten Ökotypen zeigten (van Veen *et al.*, 2016). Überflutung und Metallstress gehen oft gleichzeitig einher, da Überflutung zu einer Veränderung im Redox-Potenzial der Erde 105 und somit zu einer erhöhten Verfügbarkeit von Mn²⁺ und Fe²⁺ führt (Setter *et al.*, 2009; Shabala, 2011; Zeng *et al.*, 2013). Interessanterweise besitzen einige Feuchtgebietspflanzen sogar eine erhöhte Toleranz gegenüber Metallakkumulation (Yang & Ye, 2009). Unter den überrepräsentierten GO-Kategorien der toleranten Arten befanden sich einige Prozesse, die mit Metallen assoziiert sind: "transition metal ion transport", "iron ion transport" und "cellular response to iron ion starvation" (Abb. 40a). Inwiefern die Induktion dieser Prozesse allerdings zur Überflutungstoleranz beiträgt, ist weiterhin unklar.

4.4.4 Oxidativer Stress während der Überflutung und in der Regenerationsphase

Sowohl die Überflutungsphase als auch die Regenerationsphase, die mit dem Rückzug des Wassers eingeleitet wird, kann für die Pflanze gleichermaßen schädlich sein (Yeung et al., 2019). Überflutungstoleranz ist somit nicht nur abhängig vom Überleben unter Wasser, sondern auch von den Reaktionen während der Regenerationsphase. Überflutung führt zu Einschränkungen der Lichtintensität und Lichtqualität (Vervuren et al., 1999). Im Vergleich zur einfallenden Lichtintensität über der Wasseroberfläche nimmt die Unterwasser-Lichtintensität bereits 5 cm unter der Wasseroberfläche um etwa 25 % und bis 30 cm um weitere 16 % ab (Das et al., 2005). Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Pflanzen unter Kurztagbedingungen in einer Wassertiefe von ca. 17 cm überflutet. Somit waren die Pflanzen zwar tagsüber im Licht überflutet, aber vermutlich dennoch mit Lichteinbußen konfrontiert. Das spiegelt sich in der Anreicherung der GO-Kategorie "response to absence of light" in allen Arten wider (Abb. 38). Pflanzengewebe, das sich während der Überflutung an schlechte O₂- und Lichtbedingungen gewöhnt hat, ist nach der Überflutung plötzlich einer höheren Lichtintensität und einer höheren O₂-Konzentration ausgesetzt. Eine hohe Lichtintensität kann dazu führen, dass die maximale Photosynthesekapazität erreicht wird, wodurch mehr Licht absorbiert wird, als in der Photosynthese verwendet werden kann (Demmig-Adams & Adams, 1992; Chen et al., 2018). Als Folge dieses Lichtüberschusses werden vermehrt ROS gebildet, die den Photosyntheseapparat schädigen können (Demmig-Adams & Adams, 1992; Niyogi, 1999).

Bereits unter normalen Bedingungen werden ROS als Nebenprodukte des pflanzlichen Stoffwechsels gebildet. Bei O₂-Mangel, Überflutung und Wiederbelüftung wird eine verstärkte ROS-Akkumulation in verschiedenen Zellorganellen beobachtet (Sasidharan *et al.*, 2018). Überflutung führte in allen Arten zu einer Induktion von ROS-assoziierten Prozessen, aufgezeigt durch die Anreicherung der GO-Kategorien "regulation of hydrogen peroxide metabolic process" und "respiratory burst involved in defense response" (Abb. 38). ROS verursachen oxidativen Stress und induzieren Chlorophyllabbau, wodurch die (Unterwasser-) Photosynthese und damit die Bildung von wertvollen Kohlenhydraten eingeschränkt wird (Fukao *et al.*, 2006, 2011). Die Aufrechterhaltung eines hohen Chlorophyllgehalts während der Überflutung und die schnellere Chlorophyllneubildung nach der Überflutung ist jeweils

mit einer höheren Photosyntheseleistung verbunden und wirkt sich positiv auf die Überflutungstoleranz aus (Panda *et al.*, 2008; Sone & Sakagami, 2017). In *SUB1A*-Genotypen ist demnach die erhöhte Überflutungstoleranz auf einen geringeren Chlorophyllabbau bei Überflutung zurückzuführen (Fukao *et al.*, 2006). Ebenso zeichnete sich der tolerante *A. thaliana*-Ökotyp Lp2-6 während der Regenerationsphase durch eine höhere Biomasse, einen höheren Chlorophyllgehalt sowie eine schnellere Entwicklung neuer Blätter im Vergleich zum sensitiven Ökotyp Bay-0 aus (Yeung *et al.*, 2018). Die Analyse von Chlorophyllgehalt, Biomasse und die Bildung neuer Blätter erwies sich im Rahmen dieser Arbeit jedoch als schwierig, da kein passender Zeitpunkt identifiziert werden konnte, der einen direkten Vergleich der Arten ermöglichte.

4.4.5 Carboanhydrasen und Unterwasser-Photosynthese als Toleranzfaktoren?

Da im Wasser die CO₂-Verfügbarkeit für die Photosynthese stark eingeschränkt ist (Pedersen *et al.*, 2013), besitzen einige Seegräser die Fähigkeit, HCO₃⁻ durch Membranproteine aufzunehmen, welches anschließend über cytosolische CAs in CO₂ umgewandelt wird (Poschenrieder *et al.*, 2018). In einer Studie von Iversen *et al.* (2019) konnte gezeigt werden, dass in Gebieten mit hoher HCO₃⁻-Verfügbarkeit (z. B. in Seen) vermehrt Wasserpflanzen vorkommen, die HCO₃⁻ nutzen können, während diese in Gebieten mit höherer CO₂-Konzentration (z. B. im Fließgewässer) seltener zu finden sind. Die Fähigkeit zur Nutzung von HCO₃⁻ ist nur bei einer hohen HCO₃⁻-Konzentration vorteilhaft, da die Verwendung von HCO₃⁻ energieaufwendiger und die Photosynthese weniger effizient ist als bei der Verwendung von CO₂ (Iversen *et al.*, 2019). Die Analyse der amphibischen Art *H. difformis* zeigte, dass die Fähigkeit zur Nutzung von HCO₃⁻ in aquatischen Blättern höher war als in terrestrischen Blättern (Horiguchi *et al.*, 2019). Das Ausmaß der Nutzung von HCO₃⁻ als attraktive Alternative zu CO₂ ist bei Amphibienpflanzen bzw. bei Landpflanzen bei Überflutung allerdings noch weitgehend unbekannt.

Die Analyse der überflutungsinduzierten DEGs zeigte eine *Rorippa*-spezifische Anreicherung der GO-Kategorien "carbon utilization", "carbonate dehydratase activity" und "zinc ion binding", welche hauptsächlich Gene umfassten, die für CAs codieren. In *A. thaliana* existieren 8 α -CAs, 6 β -CAs und 5 γ -CAs (Dimario *et al.*, 2017), deren Expression bzw. die Expression der homologen Gene in Reaktion auf Überflutung in allen Arten näher betrachtet wurde (Abb. 42). Insbesondere *BCA3* war nur in den toleranten Arten induziert und war sogar eines der stärksten induzierten Gene in *C. pratensis* und *R. sylvestris*. Die Tatsache, dass es sich bei BCA3 (zumindest in *A. thaliana*) um eine cytosolische CA handelt (Fabre *et al.*, 2007), lies die Hypothese zu, dass BCA3 durch die Bereitstellung von CO₂ einen positiven Einfluss auf die Unterwasser-Photosynthese und somit dem Überleben in den toleranten Arten hat. Die Hypothese wurde anhand von *AtBCA3*- und *RsBCA3*-Überexpressionslinien in der sensitiven Art *A. thaliana* getestet. Der Nachweis der Überexpression erfolgte auf Transkript- und Proteinebene, wobei nur Proteine mit N-terminalem HA-Tag mittels Western-Blot detektiert werden konnten (Abb. 45, Abb. A13). Dies ist darauf zurückzuführen, dass Tetramere durch Wechselwirkungen gebildet werden, die hauptsächlich von einem C-terminalen β-Strang ausgehen, während die N-terminalen Aminosäuren offenbar kein integraler Bestandteil der Enzymstruktur sind, sondern einen flexiblen Linker bilden (Kimber & Pai, 2000). Weder *AtBCA3*- noch *RsBCA3*-Überexpressionslinien zeigten eine erhöhte Überflutungstoleranz im Vergleich zum Wildtyp Col-0 (Abb. 47). Ob *BCA3* zur Überflutungstoleranz in *R. sylvestris* beiträgt, könnte alternativ auch mittels Inaktivierung durch chemische Inhibierung oder RNAi untersucht werden. Beides konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt werden, da zum einen bisher kein erfolgreiches Transformationssystem für *R. sylvestris* zur Generierung von transgenen Pflanzen etabliert werden konnte. Zum anderen konnte die chemische Inhibierung mit Acetazolamid und Ethoxyzolamid aufgrund der geringen Löslichkeit in Wasser und der kurzen Halbwertszeit der Chemikalien nicht in einem Langzeitexperiment getestet werden.

Weiterhin ist es möglich, dass in den sensitiven Pflanzen kein Mechanismus zum Membrantransport von HCO₃⁻ existiert, wodurch die alleinige Überexpression einer cytosolischen CA (z. B. BCA3) nicht zu einer erhöhten Überflutungstoleranz führen kann. Bisher konnten zwar spezifische HCO₃⁻-Transporter aus Cyanobakterien erfolgreich in *A. thaliana* überexprimiert werden, allerdings bestimmten Signalpeptide die Lokalisierung in der inneren Chloroplastenmembran und der Einfluss auf die Photosynthese oder die Aufnahme von HCO₃⁻ wurde nicht getestet (Uehara *et al.*, 2016). Es liegt außerdem die Vermutung nahe, dass in der Plasmamembran lokalisierte CAs und Membranproteine zusammen am CO₂-Membrantransport beteiligt sind. Beispielsweise konnte gezeigt werden, dass zwei CAs in der Plasmamembran von Tabak lokalisiert sind (Mongrand *et al.*, 2004) und NtAQP1, ein Aquaporin in der Plasmamembran von Tabak, den CO₂-Membrantransport fördert (Uehlein *et al.*, 2003). In aquatischen *H. difformis*-Blättern wird außerdem ein H⁺-unabhängiger HCO₃⁻-Membrantransport vermutet (Horiguchi *et al.*, 2019). Es ist allerdings weiterhin unklar, ob und wie CO₂ bzw. HCO₃⁻ unter Wasser von anderen amphibischen Arten in die Zellen gelangt.

4.4.6 Alternative Mechanismen der Überflutungstoleranz in der Gattung Rorippa

Aufgrund des Überlebensexperiments (Abb. 9) wurden insbesondere die beiden *Rorippa*-Arten *R. palustris* und *R. sylvestris* als extrem überflutungstolerant eingestuft. Es existieren bereits einige Studien zur Reaktion von *Rorippa*-Spezies auf Überflutung (Stift *et al.*, 2008; Akman *et al.*, 2012; Sasidharan *et al.*, 2013; Sosnová & Klimešová, 2013; van Veen *et al.*, 2014). Ein direkter Vergleich von *R. sylvestris*, *R. amphibia*, *Ru. acetosa* und *Ru. palustris* offenbarte sogar eine höhere Überflutungs-toleranz in der Gattung *Rorippa* als in der Gattung *Rumex* (van Veen *et al.*, 2014). Bislang wurde

R. amphibia zwar als elongierend beschrieben (Akman *et al.*, 2012), die Elongation beschränkte sich allerdings nur auf den Blütenstängel, während das Blatt bzw. die Petiole bei Überflutung ein geringeres Wachstum zeigte als unter Kontrollbedingungen (Stift *et al.*, 2008; van Veen *et al.*, 2014). Letzteres konnte in dieser Arbeit bestätigt werden (Abb. A1b), die Elongation des Blütenstängels konnte jedoch nicht reproduziert werden, weshalb *R. amphibia* im Multispezies-Vergleich ausgeschlossen wurde.

In einer Studie von Stift *et al.* (2008) ging das verringerte Sprosswachstum in *R. sylvestris* – im Gegensatz zu *R. amphibia* – nicht mit einer Abnahme der Wurzelbiomasse einher. Es wurde vermutet, dass *R. sylvestris* somit bei Überflutung nicht nur überleben, sondern aufgrund von Unterwasser-Photosynthese sogar weiter wachsen kann, ohne die Reserven zu erschöpfen (Stift *et al.*, 2008). Die molekulare Analyse von *R. sylvestris*-Wurzeln bei Überflutung in Dunkelheit zeigte, dass *R. sylvestris* weniger in den Primärmetabolismus als vielmehr in potenzielle Anpassungsreaktionen investiert (Sasidharan *et al.*, 2013). Stark induziert wurden *CATALASE1*, das für das antioxidative Enzym Katalase codiert, und alternative, PP₁-verwendende Enzyme, welche ATP-verwendende Enzyme im Primärmetabolismus ersetzen können (Sasidharan *et al.*, 2013).

Weiterhin wurde HRE1 in R. sylvestris bei Überflutung in Dunkelheit in Wurzeln und Spross induziert, während HRE2 nur in den Wurzeln induziert wurde (van Veen et al., 2014). Die GO-Kategorie "response to anoxia", welche spezifisch in den toleranten Arten angereichert war, beinhaltete Transkripte für HRE1 und HRE2 (Abb. 40, Abb. A9), welche zu den fünf GVII ERFs in A. thaliana gehören (Nakano et al., 2006). Während RAP2.2 und RAP2.12 transkriptionelle Aktivatoren der HRGs sind, spielen HRE1 und HRE2 bei der Initiierung der Hypoxie-Antwort nur eine untergeordnete Rolle (Licausi et al., 2010; Gasch et al., 2016). Bislang sind keine Target-Gene oder Interaktionspartner der HRE-Transkriptionsfaktoren bekannt, es wird aber vermutet, dass HRE1 und HRE2 spätere Reaktionen der Hypoxie-Antwort regulieren (Licausi et al., 2010; Gasch et al., 2016). HRE1 war in A. thaliana nur nach 1 d Überflutung stark induziert, während HRE1 in R. palustris und R. sylvestris auch nach 2 d Überflutung signifikant induziert war (Abb. A9). In einer Studie von Licausi et al. (2010) wurde HRE1 bei Hypoxie nur in den Wurzeln von A. thaliana induziert, während HRE2 sowohl in den Wurzeln als auch im Spross induziert wurde. Während hre1hre2 Doppelmutanten eine verringerte Toleranz gegenüber Anoxie aufwiesen als der Wildtyp, führte eine Überexpression von HRE1 (aber nicht HRE2) zu einer erhöhten Toleranz (Licausi et al., 2010). Inwiefern HRE1 zur Überflutungstoleranz in R. sylvestris beiträgt, bleibt unklar. Aufgrund der starken Induktion von RsHRE1 im Spross bei Überflutung in Dunkelheit wurde vermutet, dass RsHRE1, womöglich ähnlich zu SUB1A, eine wichtige Rolle bei der Regulierung der Toleranzmechanismen (z. B. Quiescence-Strategie) spielt (van Veen et al., 2014).

4.5 Ausblick

In der Vergangenheit beschränkten sich molekulare Analysen von Überflutungstoleranzmechanismen hauptsächlich auf Studien der Modellpflanzen Reis und *A. thaliana*. In der vorliegenden Arbeit wurden erstmals die molekularen Reaktionen verschiedener Brassicaceae-Wildpflanzen in einem Multispezies-Vergleich mittels RNA-seq analysiert. Transkripte, die nur eine geringe oder keine Sequenzähnlichkeit zu *A. thaliana* aufwiesen, wurden dabei nicht näher betrachtet. Dennoch ist nicht auszuschließen, dass sich darunter potenzielle Kandidatengene für Überflutungstoleranz befinden. Deshalb wäre es zukünftig von Vorteil, Genfamilien anstelle von einzelnen Genen zu vergleichen. Beispielsweise ist OrthoMCL eine Methode, die nicht nur orthologe Gene verschiedener Arten, sondern auch funktionell redundante, paraloge Gene innerhalb einer Art gruppiert und so die Divergenz und Konservation von Genfamilien und biologischen Prozessen hervorhebt (Li *et al.*, 2003). Eine BLASTN-Analyse gegen *A. thaliana* kann dann herangezogen werden, um die entstandenen Genfamilien zu benennen. Diese Art der Analyse wurde z. B. bei *Rumex* und *Geranium* verwendet, um die molekularen Mechanismen der Überflutungstoleranz und der Schattenvermeidungsreaktion zu charakterisieren (van Veen *et al.*, 2013; Gommers *et al.*, 2017).

Im ersten Teil der Arbeit wurden die gegensätzlichen Wachstumsreaktionen in den Stängeln und Petiolen von *N. officinale* bei Überflutung behandelt. Die Beteiligung von Auxin an den gewebespezifischen Reaktionen konnte nicht vollständig geklärt werden. Um den Einfluss der Inhibierung des Auxin-Effluxes weiter zu untersuchen, wäre die Zugabe des synthetischen Auxins 1-Naphtylessigsäure (NAA) zum Überflutungswasser besser geeignet, da NAA durch passive Diffusion in die Zelle gelangt und die Zelle durch Efflux-Carrier verlässt (Delbarre *et al.*, 1996). Neben Auxin-Transportinhibitoren existieren auch Auxin-Antagonisten, z. B. *tert*-butoxycarbonylaminohexyl-IAA (BH-IAA), α -(phenylethyl-2-oxo)-IAA (PEO-IAA) und α -(2,4-dimethylphenylethyl-2-oxo)-IAA (Auxinole), welche die Auxin-Signaltransduktion durch Bindung an Auxin-Rezeptoren inhibieren (Hayashi *et al.*, 2008, 2012). Ein Einsatz dieser Auxin-Antagonisten könnte einen Beitrag dazu leisten, um den Einfluss von Auxin auf die gewebespezifischen Wachstumsreaktion bei Überflutung näher zu charakterisieren. In zukünftigen Studien sollte außerdem die natürlichen Variation der Elongationsantwort innerhalb verschiedener Ökotypen von *N. officinale* (Voutsina *et al.*, 2016) analysiert werden.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden die Überflutungsreaktionen der Rosettenpflanzen im Hinblick auf die Identifizierung von Toleranzmechanismen verglichen. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass das Kandidatengen *BCA3* einen positiven Einfluss auf die Unterwasser-Photosynthese hat und so zur Überflutungstoleranz beiträgt. Die Überexpression von *AtBCA3* und *RsBCA3* in *A. thaliana* führte allerdings nicht zu einer erhöhten Toleranz im Vergleich zum Wildtyp. Da der Nachweis von AtBCA3 und RsBCA3 nur mittels Western-Blot erfolgte und nicht unter Verwendung eines Aktivitätsassays bestätigt wurde, 110 kann nicht zweifelsfrei davon ausgegangen werden, dass die Überexpressionslinien für funktionelle Proteine codieren. Methoden zur Bestimmung der CA-Enzymaktivität beruhen auf Messungen der pH-Wert-Änderungen mittels pH-Meter (elektrometrisch) oder Indikatoren (kolorimetrisch), wobei bei der Extraktion auf ein geeignetes Puffersystem zur Stabilisierung der Enzyme geachtet werden muss (Wilbur & Anderson, 1948; Warrier *et al.*, 2014). Diese Methoden wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht getestet, sollten aber für die Zukunft in Betracht gezogen werden. Insbesondere, da CAs bereits unter normalen Bedingungen etwa 1-2 % des Gesamtproteins der Blätter ausmachen (Okabe *et al.*, 1984) und deshalb Unterschiede in der Enzymaktivität die Überflutungstoleranz beeinflussen könnten.

Um den Einfluss von *BCA3* auf die Unterwasser-Photosynthese und die Überflutungstoleranz in *R. sylvestris* weiter zu charakterisieren, könnten für zukünftige Analysen Blätter anstelle von gesamten Pflanzen in Kurzzeit-Experimenten untersucht werden. Dies wurde schon bei verschiedenen Arten verwendet, um den Einfluss der CA-Inhibitoren Acetazolamid und Ethoxyzolamid auf die Unterwasser-Photosyntheserate zu bestimmen (Borum *et al.*, 2016; Rubio *et al.*, 2017; Horiguchi *et al.*, 2019). Weiterhin könnte die Fähigkeit zur Nutzung von HCO₃⁻ durch eine Änderung des pH-Werts (Maberly, 1990) oder die Affinität für HCO₃⁻ bei der Unterwasser-Photosynthese als die O₂-Entwicklungsrate bei pH 8,3 relativ zu pH 6,3 bestimmt werden (Horiguchi *et al.*, 2019). Ebenfalls sollte das Ziel, *RsBCA3* und/oder andere CAs mittels RNAi zu inhibieren, weiterhin verfolgt werden. Die erfolgreiche Induktion von Kallusgewebe und Sprossregeneration aus Kallusgewebe bietet dafür bereits eine vielversprechende Grundlage zur Generierung von RNAi-Pflanzenlinien.

Überflutung im Licht und der damit verbundenen Möglichkeit zur Unterwasser-Photosynthese führt bei Landpflanzen zu einer höheren Überlebensrate als Überflutung in Dunkelheit (Blom *et al.*, 1994; Mommer & Visser, 2005; Vashisht *et al.*, 2011; Winkel *et al.*, 2013). Nicht nur CAs können die Unterwasser-Photosynthese positiv beeinflussen, sondern auch morphologische Veränderungen, die den Unterwasser-Gasaustausch verbessern, z. B. gefiederte Blätter oder eine dünnere Cuticula (Sand-Jensen & Frost-Christensen, 1999; Wells & Pigliucci, 2000; Mommer *et al.*, 2007). Im Vergleich zu den anderen Arten besitzt *R. sylvestris* bereits unter terrestrischen Bedingungen stärker gefiederte Blätter (Abb. 6b). Ob dies einen Einfluss auf die Überflutungstoleranz hat, oder ob sich terrestrische von aquatischen Blättern in *R. sylvestris* unterscheiden, könnte in Zukunft ebenfalls getestet werden. Möglicherweise könnte auch eine individuelle Analyse der Arten in Bezug auf Chlorophyllgehalt, Unterwasser-Photosyntheseleistung und Biomasse während und nach der Überflutung weitere wertvolle Informationen zu Überflutungstoleranzmechanismen liefern.

5. Literaturverzeichnis

Abiko T, Kotula L, Shiono K, Malik AI, Colmer TD, Nakazono M. 2012. Enhanced formation of aerenchyma and induction of a barrier to radial oxygen loss in adventitious roots of *Zea nicaraguensis* contribute to its waterlogging tolerance as compared with maize (*Zea mays* ssp. *mays*). *Plant, Cell and Environment* **35**: 1618–1630.

Adams DO, Yang SF. 1977. Methionine metabolism in apple tissue - implication of Sadenosylmethionine as an intermediate in the conversion of methionine to ethylene. *Plant Physiology* 60: 892–896.

Ahmadi H, Corso M, Weber M, Verbruggen N, Clemens S. 2018. CAX1 suppresses Cd-induced generation of reactive oxygen species in *Arabidopsis halleri*. *Plant Cell and Environment* **41**: 2435–2448.

Akman M, Bhikharie A V., McLean EH, Boonman A, Visser EJW, Schranz ME, Van Tienderen PH. 2012. Wait or escape? Contrasting submergence tolerance strategies of *Rorippa amphibia*, *Rorippa sylvestris* and their hybrid. *Annals of Botany* **109**: 1263–1275.

Akman M, Kleine R, van Tienderen PH, Schranz EM. 2017. Identification of the submergence tolerance QTL Come Quick Drowning1 (CQD1) in Arabidopsis thaliana. Journal of Heredity 108: 308–317.

Al-Shehbaz IA, Beilstein MA, Kellogg EA. 2006. Systematics and phylogeny of the Brassicaceae (Cruciferae): an overview. *Plant Systematics and Evolution* **259**: 89–120.

Alfieri L, Dottori F, Betts R, Salamon P, Feyen L. 2018. Multi-Model Projections of River Flood Risk in Europe under Global Warming. *Climate* 6: 6.

Apel K, Hirt H. **2004**. REACTIVE OXYGEN SPECIES: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. *Annual Review of Plant Biology* **55**: 373–399.

Armstrong W. 1979. Aeration in Higher Plants. Advances in Botanical Research 7: 225–332.

Armstrong J, Armstrong W. 2005. Rice: Sulfide-induced barriers to root radial oxygen loss, Fe²⁺ and water uptake, and lateral root emergence. *Annals of Botany* **96**: 625–638.

Aroca R, Porcel R, Ruiz-Lozano JM. 2012. Regulation of root water uptake under abiotic stress conditions. *Journal of Experimental Botany* 63: 43–57.

Asami T, Min YK, Nagata N, Yamagishi K, Takatsuto S, Fujioka S, Murofushi N, Yamaguchi I, Yoshida S. 2000. Characterization of brassinazole, a triazole-type brassinosteroid biosynthesis inhibitor. *Plant Physiology* **123**: 93–99.

Baena-González E, Rolland F, Thevelein JM, Sheen J. **2007**. A central integrator of transcription networks in plant stress and energy signalling. *Nature* **448**: 938–942.

Bailey-Serres J, Fukao T, Gibbs DJ, Holdsworth MJ, Lee SC, Licausi F, Perata P, Voesenek LACJ, van Dongen JT. 2012a. Making sense of low oxygen sensing. *Trends in Plant Science* **17**: 129–138.

Bailey-Serres J, Fukao T, Ronald P, Ismail A, Heuer S, Mackill D. 2010. Submergence tolerant rice: SUB1's journey from landrace to modern cultivar. *Rice* **3**: 138–147.

Bailey-Serres J, Lee SC, Brinton E. 2012b. Waterproofing crops: Effective flooding survival strategies. *Plant Physiology* **160**: 1698–1709.

Bailey-Serres J, Parker JE, Ainsworth EA, Oldroyd GED, Schroeder JI. **2019**. Genetic strategies for improving crop yields. *Nature* **575**: 109–118.

Bailey-Serres J, Voesenek LACJ. **2008**. Flooding Stress: Acclimations and Genetic Diversity. *Annual Review of Plant Biology* **59**: 313–339.

Bajguz A. **2007**. Metabolism of brassinosteroids in plants. *Plant Physiology and Biochemistry* **45**: 95–107.

Banti V, Mafessoni F, Loreti E, Alpi A, Perata P. **2010**. The heat-inducible transcription factor *HsfA2* enhances anoxia tolerance in Arabidopsis. *Plant Physiology* **152**: 1471–1483.

Batie M, Frost J, Frost M, Wilson JW, Schofield P, Rocha S. **2019**. Hypoxia induces rapid changes to histone methylation and reprograms chromatin. *Science* **363**: 1222–1226.

Beer S, Björk M, Hellblom F, Axelsson L. 2002. Inorganic carbon utilization in marine angiosperms (seagrasses). *Functional Plant Biology* 29: 349–354.

Beer S, Rehnberg J. 1997. The acquisition of inorganic carbon by the seagrass *Zostera marina*. *Aquatic Botany* **56**: 277–283.

Bennett MJ, Marchant A, Green HG, May ST, Ward SP, Millner PA, Walker AR, Schulz B, Feldmann KA. 1996. *Arabidopsis AUX1* gene: a permease-like regulator of root gravitropism. *Science* 273: 948–950.

Benschop JJ, Bou J, Peeters AJM, Wagemaker N, Gühl K, Ward D, Hedden P, Moritz T, Voesenek LACJ. 2006. Long-Term Submergence-Induced Elongation in *Rumex palustris* Requires Abscisic Acid-Dependent Biosynthesis of Gibberellin₁. *Plant Physiology* **141**: 1644–1652.

Benschop JJ, Jackson MB, Gühl K, Vreeburg RAM, Croker SJ, Peeters AJM, Voesenek LACJ. 2005. Contrasting interactions between ethylene and abscisic acid in *Rumex* species differing in submergence tolerance. *The Plant Journal* **44**: 756–768.

Biais B, Beauvoit B, William Allwood J, Deborde C, Maucourt M, Goodacre R, Rolin D, Moing A. 2010. Metabolic acclimation to hypoxia revealed by metabolite gradients in melon fruit. *Journal of Plant Physiology* **167**: 242–245.

Billou I, Xu J, Wildwater M, Willemsen V, Paponov I, Friml J, Heidstra R, Aida M, Palme K, Scheres B. 2005. The PIN auxin efflux facilitator network controls growth and patterning in *Arabidopsis* roots. *Nature* **433**: 39–44.

Binder S. 2010. Branched-Chain Amino Acid Metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *The Arabidopsis Book/American Society of Plant Biologists* **8**: e0137.

Bleecker AB, Schuette JL, Kende H. 1986. Anatomical analysis of growth and developmental patterns in the internode of deepwater rice. *Planta* **169**: 490–497.

Bleeker W, Hurka H. 2001. Introgressive hybridization in *Rorippa* (Brassicaceae): Gene flow and its consequences in natural and anthropogenic habitats. *Molecular Ecology* **10**: 2013–2022.

Bleeker W, Huthmann M, Hurka H. **1999**. Evolution of hybrid taxa in *Nasturtium* R. Br. (*Brassicaceae*). *Folia Geobotanica* **34**: 421–433.

Bleeker W, Klausmeyer S, Peintinger M, Dienst M. 2008. DNA sequences identify invasive alien *Cardamine* at Lake Constance. *Biological Conservation* **141**: 692–698.

Blokhina OB, Chirkova T V., Fagerstedt K V. 2001. Anoxic stress leads to hydrogen peroxide formation in plant cells. *Journal of Experimental Botany* **52**: 1179–1190.

Blokhina O, Virolainen E, Fagerstedt K V. 2003. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Annals of Botany* **91**: 179–194.

Blom CWPM, Voesenek LACJ, Banga M, Engelaar WMHG, Rijnders JGHM, van de Steeg HM, Visser EJW. 1994. Phyiological Ecology of Riverside Species: Adaptive Responses of Plants to Submergence. *Plant Physiology* **94**: 1071–1077.

Boller T, Herner RC, Kende H. **1979**. Assay for and enzymatic formation of an ethylene precursor, 1aminocyclopropane-1-carboxylic acid. *Planta* **145**: 293–303.

Borum J, Pedersen O, Kotula L, Fraser MW, Statton J, Colmer TD, Kendrick GA. **2016**. Photosynthetic response to globally increasing CO₂ of co-occurring temperate seagrass species. *Plant Cell and Environment* **39**: 1240–1250.

Bradford MM. **1976**. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**: 248–254.

Branco-Price C, Kaiser KA, Jang CJH, Larive CK, Bailey-Serres J. 2008. Selective mRNA translation coordinates energetic and metabolic adjustments to cellular oxygen deprivation and reoxygenation in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **56**: 743–755.

Branco-Price C, Kawaguchi R, Ferreira RB, Bailey-Serres J. **2005**. Genome-wide analysis of transcript abundance and translation in Arabidopsis seedlings subjected to oxygen deprivation. *Annals of Botany* **96**: 647–660.

Bräutigam A, Gowik U. **2010**. What can next generation sequencing do for you? Next generation sequencing as a valuable tool in plant research. *Plant Biology* **12**: 831–841.

Bray NL, Pimentel H, Melsted P, Pachter L. 2016. Near-optimal probabilistic RNA-seq quantification. *Nature biotechnology* **34**: 525–527.

Canales C, Barkoulas M, Galinha C, Tsiantis M. **2010**. Weeds of change: *Cardamine hirsuta* as a new model system for studying dissected leaf development. *Journal of Plant Research* **123**: 25–33.

Chakraborty AA, Laukka T, Myllykoski M, Ringel AE, Booker MA, Tolstorukov MY, Meng YJ, Meier SR, Jennings RB, Creech AL, *et al.* 2019. Histone demethylase KDM6A directly senses oxygen to control chromatin and cell fate. *Science* 363: 1217–1222.

Chandel NS, Budinger GRS, Schumacker PT. 1996. Molecular oxygen modulates cytochrome c oxidase function. *Journal of Biological Chemistry* **271**: 18672–18677.

Chen Y-E, Ma J, Wu N, Su Y-Q, Zhang Z-W, Yuan M, Zhang H-Y, Zeng X-Y, Yuan S. **2018**. The roles of *Arabidopsis* proteins of Lhcb4, Lhcb5 and Lhcb6 in oxidative stress under natural light conditions. *Plant Physiology and Biochemistry* **130**: 267–276.

Chen X, Pierik R, Peeters AJM, Poorter H, Visser EJW, Huber H, de Kroon H, Voesenek LACJ. **2010**. Endogenous Abscisic Acid as a Key Switch for Natural Variation in Flooding-Induced Shoot Elongation. *Plant Physiology* **154**: 969–977.

Chen T, Yuan F, Song J, Wang B. **2016**. Nitric oxide participates in waterlogging tolerance through enhanced adventitious root formation in the euhalophyte *Suaeda salsa*. *Functional Plant Biology* **43**: 244–253.

Cheng W-H, Endo A, Zhou L, Penney J, Chen H-C, Arroyo A, Leon P, Nambara E, Asami T, Seo M, *et al.* **2002**. A unique short-chain dehydrogenase/reductase in Arabidopsis glucose signaling and abscisic acid biosynthesis and functions. *The Plant Cell* **14**: 2723–2743.

Chiang H-H, Hwang I, Goodman HM. 1995. Isolation of the Arabidopsis GA4 locus. *The Plant Cell* **7**: 195–201.

Cho H-T, Kende H. **1997**. Expression of Expansin Genes Is Correlated with Growth in Deepwater Rice. *The Plant Cell* **9**: 1661–1671.

Cho H-Y, Loreti E, Shih M-C, Perata P. 2019. Energy and Sugar Signaling during Hypoxia. *New Phytologist*: doi: 10.1111/NPH.16326.

Cho H-Y, Wen T-N, Wang Y-T, Shih M-C. 2016. Quantitative phosphoproteomics of protein kinase SnRK1 regulated protein phosphorylation in Arabidopsis under submergence. *Journal of Experimental Botany* **67**: 2745–2760.

Choe S, Dilkes BP, Fujioka S, Takatsuto S, Sakurai A, Feldmann KA. 1998. The *DWF4* gene of Arabidopsis encodes a cytochrome P450 that mediates multiple 22α -hydroxylation steps in brassinosteroid biosynthesis. *The Plant Cell* **10**: 231–243.

Clough SJ, Bent AF. 1998. Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **16**: 735–743.

Clouse SD. **2011**. Brassinosteroids. *The Arabidopsis Book/American Society of Plant Biologists* **9**: e0151.

Colmer TD. **2003**. Long-distance transport of gases in plants: a perspective on internal aeration and radial oxygen loss from roots. *Plant, Cell and Environment* **26**: 17–36.

Colmer TD, Pedersen O. 2008a. Underwater photosynthesis and respiration in leaves of submerged wetland plants: gas films improve CO₂ and O₂ exchange. *New Phytologist* **177**: 918–926.

Colmer TD, Pedersen O. **2008b**. Oxygen dynamics in submerged rice (*Oryza sativa*). *New Phytologist* **178**: 326–334.

Colmer TD, Voesenek LACJ. **2009**. Flooding tolerance: Suites of plant traits in variable environments. *Functional Plant Biology* **36**: 665–681.

Colmer TD, Winkel A, Pedersen O. **2011**. A perspective on underwater photosynthesis in submerged terrestrial wetland plants. *AoB PLANTS* **11**: plr030.

Cook SA, Johnson MP. **1968**. Adaptation to Heterogeneous Environments. I. Variation in Heterophylly in *Ranunculus flammula* L. *Evolution* **22**: 496–516.

Cookson C, Osborne DJ. **1978**. The stimulation of cell extension by ethylene and auxin in aquatic plants. *Planta* **144**: 39–47.

Cookson SJ, Yadav UP, Klie S, Morcuende R, Usadel B, Lunn JE, Stitt M. **2016**. Temporal kinetics of the transcriptional response to carbon depletion and sucrose readdition in *Arabidopsis* seedlings. *Plant, Cell and Environment* **39**: 768–786.

Cosgrove DJ. 2000. Expansive growth of plant cell walls. *Plant Physiology and Biochemistry* **38**: 109–124.

Cox MCH, Benschop JJ, Vreeburg RAM, Wagemaker CAM, Moritz T, Peeters AJM, Voesenek LACJ. 2004. The Roles of Ethylene, Auxin, Abscisic Acid, and Gibberellin in the Hyponastic Growth of Submerged *Rumex palustris* Petioles. *Plant Physiology* **136**: 2948–2960.

Cox MCH, Millenaar FF, de Jong van Berkel YEM, Peeters AJM, Voesenek LACJ. 2003. Plant Movement. Submergence-Induced Petiole Elongation in *Rumex palustris* Depends on Hyponastic Growth. *Plant Physiology* **132**: 282–291.

Cox MCH, Peeters AJM, Voesenek LACJ. **2006**. The stimulating effects of ethylene and auxin on petiole elongation and on hyponastic curvature are independent processes in submerged *Rumex palustris*. *Plant, Cell and Environment* **29**: 282–290.

Curtis MD, Grossniklaus U. 2003. A Gateway Cloning Vector Set for High-Throughput Functional Analysis of Genes in Planta. *Plant Physiology* **133**: 462–469.

Czechowski T, Stitt M, Altmann T, Udvardi MK, Scheible W-R. **2005**. Genome-Wide Identification and Testing of Superior Reference Genes for Transcript Normalization in Arabidopsis. *Plant Physiology* **139**: 5–17.

Dai X, Mashiguchi K, Chen Q, Kasahara H, Kamiya Y, Ojha S, DuBois J, Ballou D, Zhao Y. **2013**. The biochemical mechanism of auxin biosynthesis by an *Arabidopsis* YUCCA flavin-containing monooxygenase. *Journal of Biological Chemistry* **288**: 1448–1457.

Das KK, Sarkar RK, Ismail AM. **2005**. Elongation ability and non-structural carbohydrate levels in relation to submergence tolerance in rice. *Plant Science* **168**: 131–136.

Dawood T, Rieu I, Wolters-Arts M, Derksen EB, Mariani C, Visser EJW. **2014**. Rapid flooding-induced adventitious root development from preformed primordia in *Solanum dulcamara*. *AoB PLANTS* **6**: plt058.

Dawood T, Yang X, Visser EJW, te Beek TAH, Kensche PR, Cristescu SM, Lee S, Floková K, Nguyen D, Mariani C, et al. 2016. A Co-Opted Hormonal Cascade Activates Dormant Adventitious Root Primordia upon Flooding in *Solanum dulcamara*. *Plant Physiology* **170**: 2351–2364.

Delbarre A, Muller P, Imhoff V, Guern J. 1996. Comparison of mechanisms controlling uptake and accumulation of 2,4-dichlorophenoxy acetic acid, naphthalene-1-acetic acid, and indole-3-acetic acid in suspension-cultured tobacco cells. *Planta* **198**: 532–541.

Demmig-Adams B, Adams WW. **1992**. Photoprotection and other responses of plants to high light stress. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **43**: 599–626.

Dewitte W, Murray JAH. 2003. The Plant Cell Cycle. Annual Review of Plant Biology 54: 235–264.

Dimario RJ, Clayton H, Mukherjee A, Ludwig M, Moroney J V. 2017. Plant Carbonic Anhydrases: Structures, Locations, Evolution, and Physiological Roles. *Molecular Plant* **10**: 30–46.

Dissmeyer N. 2019. Conditional Protein Function via N-Degron Pathway–Mediated Proteostasis in Stress Physiology. *Annual Review of Plant Biology* **70**: 83–117.

Dong T, Xu Z-Y, Park Y, Kim DH, Lee Y, Hwang I. 2014. Abscisic Acid Uridine Diphosphate Glucosyltransferases Play a Crucial Role in Abscisic Acid Homeostasis in Arabidopsis. *Plant Physiology* **165**: 277–289.

van Dongen JT, Licausi F. **2015**. Oxygen sensing and signaling. *Annual Review of Plant Biology* **66**: 345–367.

Dornbusch T, Michaud O, Xenarios I, Fankhauser C. **2014**. Differentially phased leaf growth and movements in *Arabidopsis* depend on coordinated circadian and light regulation. *The Plant Cell* **26**: 3911–3921.

Drew MC, He C, Morgan PW. **2000**. Programmed cell death and aerenchyma formation in roots. *Trends in plant science* **5**: 123–127.

Duanmu D, Miller AR, Horken KM, Weeks DP, Spalding MH. **2009**. Knockdown of limiting-CO₂-induced gene *HLA3* decreases HCO₃⁻ transport and photosynthetic Ci affinity in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**: 5990–5995.

Duckham SC, Linforth RST, Taylor IB. **1991**. Abscisic-acid-deficient mutants at the *aba* gene locus of *Arabidopsis thaliana* are impaired in the epoxidation of zeaxanthin. *Plant, Cell and Environment* **14**: 601–606.

Ejiri M, Shiono K. 2019. Prevention of radial oxygen loss is associated with exodermal suberin along adventitious roots of annual wild species of *Echinochloa*. *Frontiers in Plant Science* **10**: 254.

Evans DE. 2003. Aerenchyma formation. New Phytologist 161: 35–49.

Fabre N, Reiter IM, Becuwe-Linka N, Genty B, Rumeau D. **2007**. Characterization and expression analysis of genes encoding α and β carbonic anhydrases in *Arabidopsis*. *Plant, Cell and Environment*

30: 617–629.

Farnese FS, Menezes-Silva PE, Gusman GS, Oliveira JA. **2016**. When Bad Guys Become Good Ones: The Key Role of Reactive Oxygen Species and Nitric Oxide in the Plant Responses to Abiotic Stress. *Frontiers in Plant Science* **7**: 471.

Farré EM. 2012. The regulation of plant growth by the circadian clock. *Plant Biology* 14: 401–410.

Ferrari S, Plotnikova JM, De Lorenzo G, Ausubel FM. **2003**. *Arabidopsis* local resistance to *Botrytis cinerea* involves salicylic acid and camalexin and requires *EDS4* and *PAD2*, but not *SID2*, *EDS5* or *PAD4*. *The Plant Journal* **35**: 193–205.

Finkelstein R. 2013. Abscisic Acid Biosynthesis and Response. *The Arabidopsis Book/American Society of Plant Biologists* **11**: e0166.

Floková K, Tarkowská D, Miersch O, Strnad M, Wasternack C, Novák O. **2014**. UHPLC-MS/MS based target profiling of stress-induced phytohormones. *Phytochemistry* **105**: 147–157.

Frachisse J-M, Thomine S, Colcombet J, Guern J, Barbier-Brygoo H. **1999**. Sulfate Is Both a Substrate and an Activator of the Voltage-Dependent Anion Channel of Arabidopsis Hypocotyl Cells. *Plant Physiology* **121**: 253–261.

Friml J. 2003. Auxin transport - shaping the plant. *Current Opinion in Plant Biology* 6: 7–12.

Frommer WB, von Wirén N. 2002. Ping-pong with boron. Nature 410: 282–283.

Frost-Christensen H, Jørgensen LB, Floto F. **2003**. Species specificity of resistance to oxygen diffusion in thin cuticular membranes from amphibious plants. *Plant, Cell and Environment* **26**: 561–569.

Frost-Christensen H, Sand-Jensen K. 1995. Comparative kinetics of photosynthesis in floating and submerged *Potamogeton* leaves. *Aquatic Botany* **51**: 121–134.

Fry SC, Smith RC, Renwick KF, Martin DJ, Hodge SK, Matthews KJ. 1992. Xyloglucan endotransglycosylase, a new wall-loosening enzyme activity from plants. *Biochemical Journal* **282**: 821–828.

Fujioka S, Li J, Choi Y-H, Seto H, Takatsuto S, Noguchi T, Watanabe T, Kuriyama H, Yokota T, Chory J, *et al.* **1997**. The Arabidopsis *deetiolated2* mutant is blocked early in brassinosteroid biosynthesis. *The Plant Cell* **9**: 1951–1962.

Fujioka S, Sakurai A. **1997**. Biosynthesis and metabolism of brassinosteroids. *Physiologia Plantarum* **100**: 710–715.

Fujioka S, Yokota T. 2003. Biosynthesis and metabolism of brassinosteroids. *Annual Review of Plant Biology* **54**: 137–164.

Fujita M, Fujita Y, Noutoshi Y, Takahashi F, Narusaka Y, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. 2006. Crosstalk between abiotic and biotic stress responses: a current view from the points of convergence in the stress signaling networks. *Current Opinion in Plant Biology* **9**: 436–442.

Fukao T, Bailey-Serres J. **2004**. Plant responses to hypoxia - Is survival a balancing act? *TRENDS in Plant Science* **9**: 449–456.

Fukao T, Bailey-Serres J. 2008. Submergence tolerance conferred by *Sub1A* is mediated by SLR1 and SLRL1 restriction of gibberellin responses in rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**: 16814–16819.

Fukao T, Barrera-Figueroa BE, Juntawong P, Peña-Castro JM. **2019**. Submergence and Waterlogging Stress in Plants: A Review Highlighting Research Opportunities and Understudied Aspects. *Frontiers in Plant Science* **10**: 340.

Fukao T, Xu K, Ronald PC, Bailey-Serres J. 2006. A Variable Cluster of Ethylene Response Factor–Like Genes Regulates Metabolic and Developmental Acclimation Responses to Submergence in Rice. *The Plant Cell* **18**: 2021–2034.

Fukao T, Yeung E, Bailey-Serres J. 2011. The Submergence Tolerance Regulator SUB1A Mediates Crosstalk between Submergence and Drought Tolerance in Rice. *The Plant Cell* **23**: 412–427.

Fukushima S, Mori M, Sugano S, Takatsuji H. **2016**. Transcription factor WRKY62 plays a role in pathogen defense and hypoxia-responsive gene expression in rice. *Plant and Cell Physiology* **57**: 2541–2551.

Gan X, Hay A, Kwantes M, Haberer G, Hallab A, Ioio R Dello, Hofhuis H, Pieper B, Cartolano M, Neumann U, et al. 2016. The *Cardamine hirsuta* genome offers insight into the evolution of morphological diversity. *Nature Plants* 2: 16167.

Garcês H, Durzan D, Pedroso MC. 2001. Mechanical stress elicits nitric oxide formation and DNA fragmentation in *Arabidopsis thaliana*. *Annals of Botany* 87: 567–574.

Gasch P, Fundinger M, Müller JT, Lee T, Bailey-Serres J, Mustroph A. **2016**. Redundant ERF-VII Transcription Factors Bind to an Evolutionarily Conserved *cis*-Motif to Regulate Hypoxia-Responsive Gene Expression in Arabidopsis. *The Plant Cell* **28**: 160–180.

Gaston S, Zabalza A, González EM, Arrese-Igor C, Aparicio-Tejo PM, Royuela M. 2002. Imazethapyr, an inhibitor of the branched-chain amino acid biosynthesis, induces aerobic fermentation in pea plants. *Physiologia Plantarum* **114**: 524–532.

Geigenberger P. 2003. Response of plant metabolism to too little oxygen. *Current Opinion in Plant Biology* **6**: 247–256.

Geigenberger P, Fernie AR, Gibon Y, Christ M, Stitt M. **2000**. Metabolic activity decreases as an adaptive response to low internal oxygen in growing potato tubers. *Biological Chemistry* **381**: 723–740.

Gibbs DJ, Isa NM, Movahedi M, Lozano-Juste J, Mendiondo GM, Berckhan S, Marín-de la Rosa N, Vicente Conde J, Sousa Correia C, Pearce SP, et al. 2014. Nitric Oxide Sensing in Plants Is Mediated by Proteolytic Control of Group VII ERF Transcription Factors. *Molecular Cell* 53: 369–379.

Gibbs DJ, Lee SC, Isa NM, Gramuglia S, Fukao T, Bassel GW, Correia CS, Corbineau F, Theodoulou FL, Bailey-Serres J, et al. 2011. Homeostatic response to hypoxia is regulated by the N-end rule pathway in plants. *Nature* 479: 415–418.

Gibbs J, Morrell S, Valdez A, Setter TL, Greenway H. **2000**. Regulation of alcoholic fermentation in coleoptiles of two rice cultivars differing in tolerance to anoxia. *Journal of Experimental Botany* **51**: 785–796.

Gibbs DJ, Tedds HM, Labandera A-M, Bailey M, White MD, Hartman S, Sprigg C, Mogg SL, Osborne R, Dambire C, et al. 2018. Oxygen-dependent proteolysis regulates the stability of angiosperm polycomb repressive complex 2 subunit VERNALIZATION 2. *Nature Communications* **9**: 5438.

Glawischnig E. 2007. Camalexin. Phytochemistry 68: 401–406.

Gommers CMM, Keuskamp DH, Buti S, van Veen H, Koevoets IT, Reinen E, Voesenek LACJ, Pierik R. 2017. Molecular Profiles of Contrasting Shade Response Strategies in Wild Plants: Differential Control of Immunity and Shoot Elongation. *The Plant Cell* **29**: 331–344.

Grabherr MG, Haas BJ, Yassour M, Levin JZ, Thompson DA, Amit I, Adiconis X, Fan L, Raychowdhury R, Zeng Q, *et al.* 2011. Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. *Nature Biotechnology* 29: 644–652.

Grant SGN, Jessee J, Bloom FR, Hanahan D. 1990. Differential plasmid rescue from transgenic mouse

DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**: 4645–4649.

Greve T. M, Borum J., O. P. 2003. Merismatic oxygen variability in eelgrass (*Zostera marina*). *Limnology* and Oceanography 48: 210–216.

Guo M, Liu J-H, Ma X, Luo D-X, Gong Z-H, Lu M-H. **2016**. The plant heat stress transcription factors (HSFs): Structure, regulation, and function in response to abiotic stresses. *Frontiers in Plant Science* **7**: 114.

Gupta KJ, Hebelstrup KH, Mur LAJ, Igamberdiev AU. **2011**. Plant hemoglobins: Important players at the crossroads between oxygen and nitric oxide. *FEBS Letters* **585**: 3843–3849.

Guzmán P, Ecker JR. **1990**. Exploiting the Triple Response of Arabidopsis To Identify Ethylene-Related Mutants. *The Plant Cell* **2**: 513–523.

Hager A, Menzel H, Krauss A. 1971. Versuche und Hypothese zur Primärwirkung des Auxins beim Streckungswachstum. *Planta* 100: 47–75.

Hartman S, Liu Z, van Veen H, Vicente J, Reinen E, Martopawiro S, Zhang H, van Dongen N, Bosman F, Bassel GW, *et al.* 2019. Ethylene-mediated nitric oxide depletion pre-adapts plants to hypoxia stress. *Nature Communications* **10**: 4020.

Hattori Y, Nagai K, Furukawa S, Song X-J, Kawano R, Sakakibara H, Wu J, Matsumoto T, Yoshimura A, Kitano H, *et al.* 2009. The ethylene response factors *SNORKEL1* and *SNORKEL2* allow rice to adapt to deep water. *Nature* 460: 1026–1030.

Hay A, Tsiantis M. 2006. The genetic basis for differences in leaf form between *Arabidopsis thaliana* and its wild relative *Cardamine hirsuta*. *Nature Genetics* **38**: 942–947.

Hayashi K-I, Neve J, Hirose M, Kuboki A, Shimada Y, Kepinski S, Nozaki H. 2012. Rational design of an auxin antagonist of the SCFTIR1 auxin receptor complex. ACS Chemical Biology 7: 590–598.

Hayashi K-I, Tan X, Zheng N, Hatate T, Kimura Y, Kepinski S, Nozaki H. 2008. Small-molecule agonists and antagonists of F-box protein-substrate interactions in auxin perception and signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**: 5632–5637.

Hayes S, Pantazopoulou CK, van Gelderen K, Reinen E, Tween AL, Sharma A, de Vries M, Prat S, Schuurink RC, Testerink C, *et al.* 2019. Soil Salinity Limits Plant Shade Avoidance. *Current Biology* 29: 1669–1676.

He JB, Bögemann GM, van De Steeg HM, Rijnders JGHM, Voesenek LACJ, Blom CWPM. 1999. Survival tactics of *Ranunculus* species in river floodplains. *Oecologia* 118: 1–8.

Helliwell CA, Chandler PM, Poole A, Dennis ES, Peacock WJ. 2001. The CYP88A cytochrome P450, *ent*-kaurenoic acid oxidase, catalyzes three steps of the gibberellin biosynthesis pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**: 2065–2070.

Helliwell CA, Sheldon CC, Olive MR, Walker AR, Zeevaart JAD, Peacock WJ, Dennis ES. 1998. Cloning of the *Arabidopsis ent*-kaurene oxidase gene *GA3*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 9019–9024.

Herzog M, Pedersen O. 2014. Partial versus complete submergence: snorkelling aids root aeration in *Rumex palustris* but not in *R. acetosa. Plant, Cell and Environment* 37: 2381–2390.

Hewett-Emmett D, Tashian RE. **1996**. Functional diversity, conservation, and convergence in the evolution of the α -, β -, and γ -carbonic anhydrase gene families. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **5**: 50–77.

Hirabayashi Y, Kanae S, Emori S, Oki T, Kimoto M. **2008**. Global projections of changing risks of floods and droughts in a changing climate. *Hydrological Sciences Journal* **53**: 754–772.

Hirabayashi Y, Mahendran R, Koirala S, Konoshima L, Yamazaki D, Watanabe S, Kim H, Kanae S. 2013. Global flood risk under climate change. *Nature Climate Change* **3**: 816–821.

Ho QT, Verboven P, Verlinden BE, Herremans E, Wevers M, Carmeliet J, Nicolaï BM. **2011**. A Three-Dimensional Multiscale Model for Gas Exchange in Fruit. *Plant Physiology* **155**: 1158–1168.

Hoffmann-Benning S, Kende H. **1992**. On the Role of Abscisic Acid and Gibberellin in the Regulation of Growth in Rice. *Plant Physiology* **99**: 1156–1161.

Hofhuis H, Moulton D, Lessinnes T, Routier-Kierzkowska A-L, Bomphrey RJ, Mosca G, Reinhardt H, Sarchet P, Gan X, Tsiantis M, *et al.* 2016. Morphomechanical innovation drives explosive seed dispersal. *Cell* 166: 222–233.

Hopkins RJ, van Dam NM, van Loon JJA. 2009. Role of glucosinolates in insect-plant relationships and multitrophic interactions. *Annual Review of Entomology* **54**: 57–83.

Horiguchi G, Nemoto K, Yokoyama T, Hirotsu N. 2019. Photosynthetic acclimation of terrestrial and submerged leaves in the amphibious plant *Hygrophila difformis*. *AoB PLANTS* **11**: plz009.

Hörmann F, Küchler M, Sveshnikov D, Oppermann U, Li Y, Soll J. 2004. Tic32, an essential component in chloroplast biogenesis. *The Journal of Biological Chemistry* **279**: 34756–34762.

Horton RF, Samarakoon AB. 1982. Petiole growth in the celery-leaved crowfoot (*Ranunculus sceleratus* L.): Effects of auxin-transport inhibitors. *Aquatic Botany* 13: 97–104.

Howard HW, Lyon AG. **1952**. *Nasturtium officinale* R. Br. (*Rorippa Nasturtium-Aquaticum* (L.) Hayek). *Journal of Ecology* **40**: 228–245.

Hsu F-C, Chou M-Y, Chou S-J, Li Y-R, Peng H-P, Shih M-C. **2013**. Submergence Confers Immunity Mediated by the WRKY22 Transcription Factor in Arabidopsis. *The Plant Cell* **25**: 2699–2713.

Hsu F-C, Chou M-Y, Peng H-P, Chou S-J, Shih M-C. 2011. Insights into hypoxic systemic responses based on analyses of transcriptional regulation in *Arabidopsis*. *PLoS ONE* **6**: e28888.

Hunter MC, Smith RG, Schipanski ME, Atwood LW, Mortensen DA. 2017. Agriculture in 2050: Recalibrating targets for sustainable intensification. *BioScience* 67: 386–391.

Husar S, Berthiller F, Fujioka S, Rozhon W, Khan M, Kalaivanan F, Elias L, Higgins GS, Li Y, Schuhmacher R, *et al.* 2011. Overexpression of the *UGT73C6* alters brassinosteroid glucoside formation in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biology* **11**: 51.

Ismond KP, Dolferus R, De Pauw M, Dennis ES, Good AG. **2003**. Enhanced Low Oxygen Survival in Arabidopsis through Increased Metabolic Flux in the Fermentative Pathway. *Plant Physiology* **132**: 1292–1302.

Iversen LL, Winkel A, Baastrup-Spohr L, Hinke AB, Alahuhta J, Baattrup-Pedersen A, Birk S, Brodersen P, Chambers PA, Ecke F, *et al.* 2019. Catchment properties and the photosynthetic trait composition of freshwater plant communities. *Science* 366: 878–881.

Jackson MB. 1985. Ethylene and responses of plants to soil waterlogging and submergence. *Annual Review of Plant Physiology* 36: 145–174.

Jackson MB, Fenning TM, Drew MC, Saker LR. 1985. Aerenchyma (gas-space) formation in adventitious roots of rice (*Oryza sativa* L.) is not controlled by ethylene or small partial pressures of oxygen. *Journal of Experimental Botany* **36**: 1566–1572.

Jain A, Wilson GT, Connolly EL. 2014. The diverse roles of FRO family metalloreductases in iron and 120

copper homeostasis. Frontiers in Plant Science 5: 100.

Ji J, Strable J, Shimizu R, Koenig D, Sinha N, Scanlon MJ. 2010. WOX4 Promotes Procambial Development. *Plant Physiology* 152: 1346–1356.

Juntawong P, Girke T, Bazin J, Bailey-Serres J. 2014. Translational dynamics revealed by genome-wide profiling of ribosome footprints in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111: E203–E212.

Justin SHFW, Armstrong W. 1987. The anatomical characteristics of roots and plant response to soil flooding. *New Phytologist* 106: 465–495.

Kende H. **1993**. Ethylene Biosynthesis. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **44**: 283–307.

Kende H, van der Knaap E, Cho H-T. 1998. Deepwater rice: A Model Plant to Study Stem Elongation. *Plant Physiology* **118**: 1105–1110.

Kende H, Zeevaart JAD. 1997. The Five 'Classical' Plant Hormones. The Plant Cell 9: 1197–1210.

Khalifah RG. **1971**. The carbon dioxide hydration activity of carbonic anhydrase. *The Journal of Biological Chemistry* **246**: 2561–2573.

Kim JH, Cho H-T, Kende H. **2000**. α-Expansins in the semiaquatic ferns *Marsilea quadrifolia* and *Regnellidium diphyllum*: Evolutionary aspects and physiological role in rachis elongation. *Planta* **212**: 85–92.

Kim G-T, Fujioka S, Kozuka T, Tax FE, Takatsuto S, Yoshida S, Tsukaya H. **2005a**. CYP90C1 and CYP90D1 are involved in different steps in the brassinosteroid biosynthesis pathway in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **41**: 710–721.

Kim T-W, Hwang J-Y, Kim Y-S, Joo S-H, Soo CC, June SL, Takatsuto S, Kim S-K. **2005b**. Arabidopsis CYP85A2, a Cytochrome P450, Mediates the Baeyer-Villiger Oxidation of Castasterone to Brassinolide in Brassinosteroid Biosynthesis. *The Plant Cell* **17**: 2397–2412.

Kim J, Joo Y, Kyung J, Jeon M, Park JY, Lee HG, Chung DS, Lee E, Lee I. **2018**. A molecular basis behind heterophylly in an amphibious plant, *Ranunculus trichophyllus*. *PLoS Genetics* **14**: e1007208.

Kimber MS, Pai EF. **2000**. The active site architecture of *Pisum sativum* β -carbonic anhydrase is a mirror image of that of α -carbonic anhydrases. *The EMBO Journal* **19**: 1407–1418.

Koizumi Y, Hara Y, Yazaki Y, Sakano K, Ishizawa K. **2011**. Involvement of plasma membrane H⁺-ATPase in anoxic elongation of stems in pondweed (*Potamogeton distinctus*) turions. *New Phytologist* **190**: 421–430.

Koncz C, Schell J. 1986. The promoter of T_L-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *MGG Molecular & General Genetics* **204**: 383–396.

Koornneef M, Meinke D. **2010**. The development of Arabidopsis as a model plant. *The Plant Journal* **61**: 909–921.

Kovinich N, Kayanja G, Chanoca A, Otegui MS, Grotewold E. 2015. Abiotic stresses induce different localizations of anthocyanins in Arabidopsis. *Plant Signaling and Behavior* **10**: e1027850.

Kuc J. 1995. Phytoalexins, Stress Metabolism, and Disease Resistance in Plants. Annual Review of Phytopathology 33: 275–297.

Kunkel KE, Karl TR, Easterling DR, Redmond K, Young J, Yin X, Hennon P. 2013. Probable maximum precipitation and climate change. *Geophysical Research Letters* **40**: 1402–1408.

Kuroha T, Nagai K, Gamuyao R, Wang DR, Furuta T, Nakamori M, Kitaoka T, Adachi K, Minami A, Mori Y, *et al.* 2018. Ethylene-gibberellin signaling underlies adaptation of rice to periodic flooding. *Science* 361: 181–186.

Kushiro T, Okamoto M, Nakabayashi K, Yamagishi K, Kitamura S, Asami T, Hirai N, Koshiba T, Kamiya Y, Nambara E. 2004. The *Arabidopsis* cytochrome P450 CYP707A encodes ABA 8'-hydroxylases: key enzymes in ABA catabolism. *The EMBO Journal* **23**: 1647–1656.

Kuwabara A, Ikegami K, Koshiba T, Nagata T. 2003. Effects of ethylene and abscisic acid upon heterophylly in *Ludwigia arcuata* (Onagraceae). *Planta* 217: 880–887.

Lecharny A, Schwall M, Wagner E. 1985. Stem Extension Rate in Light-Grown Plants. *Plant Physiology* 79: 625–629.

Lee TA, Bailey-Serres J. 2019. Integrative Analysis from the Epigenome to Translatome Uncovers Patterns of Dominant Nuclear Regulation during Transient Stress. *The Plant Cell* **31**: 2573–2595.

Lee SC, Mustroph A, Sasidharan R, Vashisht D, Pedersen O, Oosumi T, Voesenek LACJ, Bailey-Serres J. 2011. Molecular characterization of the submergence response of the *Arabidopsis thaliana* ecotype Columbia. *New Phytologist* 190: 457–471.

Li Y, Guan K, Schnitkey GD, DeLucia E, Peng B. 2019. Excessive rainfall leads to maize yield loss of a comparable magnitude to extreme drought in the United States. *Global Change Biology* 25: 2325–2337.

Li J, Nagpal P, Vitart V, McMorris TC, Chory J. 1996. A role for brassinosteroids in light-dependent development of *Arabidopsis*. *Science* 272: 398–401.

Li L, Stoeckert CJJ, Roos DS. 2003. OrthoMCL: Identification of ortholog groups for eukaryotic genomes. *Genome Research* 13: 2178–2189.

Licausi F, van Dongen JT, Giuntoli B, Novi G, Santaniello A, Geigenberger P, Perata P. 2010. *HRE1* and *HRE2*, two hypoxia-inducible ethylene response factors, affect anaerobic responses in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **62**: 302–315.

Licausi F, Giorgi FM, Schmälzlin E, Usadel B, Perata P, van Dongen JT, Geigenberger P. 2011a. HREtype genes are regulated by growth-related changes in internal oxygen concentrations during the normal development of potato (*Solanum tuberosum*) tubers. *Plant and Cell Physiology* **52**: 1957–1972.

Licausi F, Kosmacz M, Weits D a., Giuntoli B, Giorgi FM, Voesenek LACJ, Perata P, van Dongen JT. **2011b**. Oxygen sensing in plants is mediated by an N-end rule pathway for protein destabilization. *Nature* **479**: 419–422.

Lin C-C, Chao Y-T, Chen W-C, Ho H-Y, Chou M-Y, Li Y-R, Wu Y-L, Yang H-A, Hsieh H, Lin C-S, et al. 2019. Regulatory cascade involving transcriptional and N-end rule pathways in rice under submergence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **116**: 3300–3309.

Liu Y, Shi L, Ye N, Liu R, Jia W, Zhang J. 2009. Nitric oxide-induced rapid decrease of abscisic acid concentration is required in breaking seed dormancy in Arabidopsis. *New Phytologist* **183**: 1030–1042.

Liu Z, Yan J-P, Li D-K, Luo Q, Yan Q, Liu Z-B, Ye L-M, Wang J-M, Li X-F, Yang Y. 2015. UDP-Glucosyltransferase71C5, a Major Glucosyltransferase, Mediates Abscisic Acid Homeostasis in Arabidopsis. *Plant Physiology* **167**: 1659–1670.

Liu Y, Ye N, Liu R, Chen M, Zhang J. 2010. H₂O₂ mediates the regulation of ABA catabolism and GA biosynthesis in *Arabidopsis* seed dormancy and germination. *Journal of Experimental Botany* **61**: 2979–2990.

Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative

PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *METHODS* **25**: 402–408.

Loreti E, Poggi A, Novi G, Alpi A, Perata P. **2005**. A Genome-Wide Analysis of the Effects of Sucrose on Gene Expression in Arabidopsis Seedlings under Anoxia. *Plant Physiology* **137**: 1130–1138.

Loreti E, Valeri MC, Novi G, Perata P. 2018. Gene Regulation and Survival under Hypoxia Requires Starch Availability and Metabolism. *Plant Physiology* **176**: 1286–1298.

Loreti E, van Veen H, Perata P. 2016. Plant responses to flooding stress. *Current Opinion in Plant Biology* 33: 64–71.

Maberly SC. **1990**. Exogenous sources of inorganic carbon for photosynthesis by marine macroalgae. *Journal of Phycology* **26**: 439–449.

Magneschi L, Kudahettige RL, Alpi A, Perata P. 2009. Expansin gene expression and anoxic coleoptile elongation in rice cultivars. *Journal of Plant Physiology* **166**: 1576–1580.

Malik AI, Islam AKMR, Colmer TD. 2011. Transfer of the barrier to radial oxygen loss in roots of *Hordeum marinum* to wheat (*Triticum aestivum*): Evaluation of four *H. marinum*-wheat amphiploids. *New Phytologist* **190**: 499–508.

Malone M, Ridge I. 1983. Ethylene-induced growth and proton excretion in the aquatic plant *Nymphoides peltata*. *Planta* **157**: 71–73.

Manzur ME, Grimoldi AA, Insausti P, Striker GG. 2009. Escape from water or remain quiescent? *Lotus tenuis* changes its strategy depending on depth of submergence. *Annals of Botany* **104**: 1163–1169.

Marchler-Bauer A, Bo Y, Han L, He J, Lanczycki CJ, Lu S, Chitsaz F, Derbyshire MK, Geer RC, Gonzales NR, et al. 2017. CDD/SPARCLE: Functional classification of proteins via subfamily domain architectures. *Nucleic Acids Research* 45: D200–D203.

Marhold K. 1994. Taxonomy of the genus *Cardamine* L. (*Cruciferae*) in the Carpathians and Pannonia. I. *Cardamine pratensis* group. *Folia Geobotanica et Phytotaxonomica* **29**: 335–374.

Mashiguchi K, Tanaka K, Sakai T, Sugawara S, Kawaide H, Natsume M, Hanada A, Yaeno T, Shirasu K, Yao H, et al. 2011. The main auxin biosynthesis pathway in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**: 18512–18517.

McCarthy DJ, Chen Y, Smyth GK. 2012. Differential expression analysis of multifactor RNA-Seq experiments with respect to biological variation. *Nucleic Acids Research* **40**: 4288–4297.

McQueen-Mason SJ, Cosgrove DJ. 1995. Expansin Mode of Action on Cell Walls (Analysis of Wall Hydrolysis, Stress Relaxation, and Binding). *Plant Physiology* **107**: 87–100.

Mergemann H, Sauter M. **2000**. Ethylene Induces Epidermal Cell Death at the Site of Adventitious Root Emergence in Rice. *Plant Physiology* **124**: 609–614.

Métraux J-P, Kende H. 1984. The cellular basis of the elongation response in submerged deep-water rice. *Planta* **160**: 73–77.

Micheli F. **2001**. Pectin methylesterases: cell wall enzymes with important roles in plant physiology. *TRENDS in Plant Science* **6**: 414–419.

Minami A, Yano K, Gamuyao R, Nagai K, Kuroha T, Ayano M, Nakamori M, Koike M, Kondo Y, Niimi Y, *et al.* 2018. Time-Course Transcriptomics Analysis Reveals Key Responses of Submerged Deepwater Rice to Flooding. *Plant Physiology* **176**: 3081–3102.

Miyashita Y, Dolferus R, Ismond KP, Good AG. **2007**. Alanine aminotransferase catalyses the breakdown of alanine after hypoxia in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **49**: 1108–1121.

Mommer L, Lenssen JPM, Huber H, Visser EJW, De Kroon H. **2006a**. Ecophysiological determinants of plant performance under flooding: A comparative study of seven plant families. *Journal of Ecology* **94**: 1117–1129.

Mommer L, Pedersen O, Visser EJW. **2004**. Acclimation of a terrestrial plant to submergence facilitates gas exchange under water. *Plant, Cell and Environment* **27**: 1281–1287.

Mommer L, Pons TL, Visser EJW. **2006b**. Photosynthetic consequences of phenotypic plasticity in response to submergence: *Rumex palustris* as a case study. *Journal of Experimental Botany* **57**: 283–290.

Mommer L, Pons TL, Wolters-Arts M, Venema JH, Visser EJW. **2005**. Submergence-Induced Morphological, Anatomical, and Biochemical Responses in a Terrestrial Species Affect Gas Diffusion Resistance and Photosynthetic Performance. *Plant Physiology* **139**: 497–508.

Mommer L, Visser EJW. **2005**. Underwater photosynthesis in flooded terrestrial plants: a matter of leaf plasticity. *Annals of Botany* **96**: 581–589.

Mommer L, Wolters-Arts M, Andersen C, Visser EJW, Pedersen O. **2007**. Submergence-induced leaf acclimation in terrestrial species varying in flooding tolerance. *New Phytologist* **176**: 337–345.

Mongrand S, Morel J, Laroche J, Claverol S, Carde J-P, Hartmann M-A, Bonneu M, Simon-Plas F, Lessire R, Bessoule J-J. 2004. Lipid rafts in higher plant cells: Purification and characterization of triton X-100-insoluble microdomains from tobacco plasma membrane. *Journal of Biological Chemistry* 279: 36277–36286.

Moons A, Valcke R, Van Montagu M. **1998**. Low-oxygen stress and water deficit induce cytosolic pyruvate orthophosphate dikinase (PPDK) expression in roots of rice, a C₃ plant. *The Plant Journal* **15**: 89–98.

Mori Y, Kurokawa Y, Koike M, Malik AI, Colmer TD, Ashikari M, Pedersen O, Nagai K. 2019. Diel O₂ Dynamics in Partially and Completely Submerged Deepwater Rice: Leaf Gas Films Enhance Internodal O₂ Status, Influence Gene Expression and Accelerate Stem Elongation for 'Snorkelling' during Submergence. *Plant and Cell Physiology* **60**: 973–985.

Moroney J V., Bartlett SG, Samuelsson G. 2001. Carbonic anhydrases in plants and algae. *Plant, Cell and Environment* 24: 141–153.

Murashige T, Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* **15**: 473–497.

Musgrave A, Walters J. 1974. Ethylene and buoyancy control rachis elongation of the semi-aquatic fern *Regnillidium diphyllum*. *Planta* **121**: 51–56.

Mustroph A. 2018a. Improving Flooding Tolerance of Crop Plants. Agronomy 8: 160.

Mustroph A. 2018b. Flooding Stress in Plants. In: eLS. John Wiley & Sons, Ltd. Chichester. doi: 10.1002/9780470015902.a0001317.pub3.

Mustroph A, Boamfa EI, Laarhoven LJJ, Harren FJM, Albrecht G, Grimm B. **2006**. Organ-specific analysis of the anaerobic primary metabolism in rice and wheat seedlings. I: Dark ethanol production is dominated by the shoots. *Planta* **225**: 103–114.

Mustroph A, Lee SC, Oosumi T, Zanetti ME, Yang H, Ma K, Yaghoubi-Masihi A, Fukao T, Bailey-Serres J. 2010. Cross-Kingdom Comparison of Transcriptomic Adjustments to Low-Oxygen Stress Highlights Conserved and Plant-Specific Responses. *Plant Physiology* **152**: 1484–1500.

Mustroph A, Zanetti ME, Jang CJH, Holtan HE, Repetti PP, Galbraith DW, Girke T, Bailey-Serres J. 2009. Profiling translatomes of discrete cell populations resolves altered cellular priorities during

hypoxia in Arabidopsis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **106**: 18843–18848.

Myhre G, Alterskjær K, Stjern CW, Hodnebrog Ø, Marelle L, Samset BH, Sillmann J, Schaller N, Fischer E, Schulz M, *et al.* 2019. Frequency of extreme precipitation increases extensively with event rareness under global warming. *Scientific Reports* **9**: 16063.

Nakajima K, Tanaka A, Matsuda Y. 2013. SLC4 family transporters in a marine diatom directly pump bicarbonate from seawater. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**: 1767–1772.

Nakano T, Suzuki K, Fujimura T, Shinshi H. **2006**. Genome-Wide Analysis of the ERF Gene Family. *Plant Physiology* **140**: 411–432.

Nakayama H, Nakayama N, Seiki S, Kojima M, Sakakibara H, Sinha N, Kimura S. 2014. Regulation of the KNOX-GA Gene Module Induces Heterophyllic Alteration in North American Lake Cress. *The Plant Cell* 26: 4733–4748.

Neff MM, Nguyen SM, Malancharuvil EJ, Fujioka S, Noguchi T, Seto H, Tsubuki M, Honda T, Takatsuto S, Yoshida S, et al. 1999. BAS1: A gene regulating brassinosteroid levels and light responsiveness in Arabidopsis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 96: 15316–15323.

Nguyen D, D'Agostino N, Tytgat TOG, Sun P, Lortzing T, Visser EJW, Cristescu SM, Steppuhn A, Mariani C, van Dam NM, *et al.* 2016. Drought and flooding have distinct effects on herbivore-induced responses and resistance in *Solanum dulcamara*. *Plant, Cell and Environment* **39**: 1485–1499.

Nielsen SL, Sand-Jensen K. **1993**. Photosynthetic implications of heterophylly in *Batrachium peltatum* (Schrank) Presl. *Aquatic Botany* **44**: 361–371.

Niyogi KK. **1999**. PHOTOPROTECTION REVISITED: Genetic and Molecular Approaches. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **50**: 333–359.

Ogawa D, Yamaguchi K, Nishiuchi T. **2007**. High-level overexpression of the *Arabidopsis HsfA2* gene confers not only increased themotolerance but also salt/osmotic stress tolerance and enhanced callus growth. *Journal of Experimental Botany* **58**: 3373–3383.

Okabe K, Yang S-Y, Tsuzuki M, Miyachi S. **1984**. Carbonic anhydrase: Its content in spinach leaves and its taxonomic diversity studied with anti-spinach leaf carbonic anhydrase antibody. *Plant Science Letters* **33**: 145–153.

Olsen JL, Rouzé P, Verhelst B, Lin Y-C, Bayer T, Collen J, Dattolo E, De Paoli E, Dittami S, Maumus F, *et al.* 2016. The genome of the seagrass *Zostera marina* reveals angiosperm adaptation to the sea. *Nature* 530: 331–335.

Omata T, Price GD, Badger MR, Okamura M, Gohta S, Ogawa T. **1999**. Identification of an ATP-binding cassette transporter involved in bicarbonate uptake in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7942. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**: 13571–13576.

Ookawara R, Satoh S, Yoshioka T, Ishizawa K. 2005. Expression of α -expansin and xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase genes associated with shoot elongation enhanced by anoxia, ethylene and carbon dioxide in arrowhead (*Sagittaria pygmaea* Miq.) tubers. *Annals of Botany* **96**: 693–702.

Osuna D, Usadel B, Morcuende R, Gibon Y, Bläsing OE, Höhne M, Günter M, Kamlage B, Trethewey R, Scheible W-R, *et al.* 2007. Temporal responses of transcripts, enzyme activities and metabolites after adding sucrose to carbon-deprived Arabidopsis seedlings. *The Plant Journal* **49**: 463–491.

Panda D, Sharma SG, Sarkar RK. **2008**. Chlorophyll fluorescence parameters, CO₂ photosynthetic rate and regeneration capacity as a result of complete submergence and subsequent re-emergence in rice (*Oryza sativa* L.). *Aquatic Botany* **88**: 127–133.

Pandey SP, Somssich IE. **2009**. The Role of WRKY Transcription Factors in Plant Immunity. *Plant Physiology* **150**: 1648–1655.

Pearce DME, Jackson MB. 1991. Comparison of Growth Responses of Barnyard Grass (*Echinochloa oryzoides*) and Rice (*Oryza sativa*) to Submergence, Ethylene, Carbon Dioxide and Oxygen Shortage. Annals of Botany **68**: 201–209.

Pedersen O, Colmer TD, Sand-Jensen K. 2013. Underwater photosynthesis of submerged plants – recent advances and methods. *Frontiers in Plant Science* **4**: 140.

Pedersen O, Rich SM, Colmer TD. **2009**. Surviving floods: Leaf gas films improve O₂ and CO₂ exchange, root aeration, and growth of completely submerged rice. *The Plant Journal* **58**: 147–156.

Pedersen O, Vos H, Colmer TD. **2006**. Oxygen dynamics during submergence in the halophytic stem succulent *Halosarcia pergranulata*. *Plant, Cell and Environment* **29**: 1388–1399.

Pelloux J, Rustérucci C, Mellerowicz EJ. **2007**. New insights into pectin methylesterase structure and function. *TRENDS in Plant Science* **12**: 267–277.

Peres ALGL, Soares JS, Tavares RG, Righetto G, Zullo MAT, Mandava NB, Menossi M. 2019. Brassinosteroids, the sixth class of phytohormones: A molecular view from the discovery to hormonal interactions in plant development and stress adaptation. *International Journal of Molecular Sciences* **20**: 331.

Pérez-Salamó I, Papdi C, Rigó G, Zsigmond L, Vilela B, Lumbreras V, Nagy I, Horváth B, Domoki M, Darula Z, et al. 2014. The Heat Shock Factor A4A Confers Salt Tolerance and Is Regulated by Oxidative Stress and the Mitogen-Activated Protein Kinases MPK3 and MPK6. *Plant Physiology* **165**: 319–334.

Petrášek J, Mravec J, Bouchard R, Blakeslee JJ, Abas M, Seifertová D, Wiśniewska J, Tadele Z, Kubeš M, Čovanová M, et al. 2006. PIN proteins perform a rate-limiting function in cellular auxin efflux. *Science* **312**: 914–918.

Phillips AL, Ward DA, Uknes S, Appleford NEJ, Lange T, Huttly AK, Gaskin P, Graebe JE, Hedden P. **1995**. Isolation and Expression of Three Gibberellin 20-Oxidase cDNA Clones from Arabidopsis. *Plant Physiology* **108**: 1049–1057.

Pierik R, van Aken JM, Voesenek LACJ. 2009. Is elongation-induced leaf emergence beneficial for submerged *Rumex* species? *Annals of Botany* **103**: 353–357.

Pierik R, Tholen D, Poorter H, Visser EJW, Voesenek LACJ. **2006**. The Janus face of ethylene: growth inhibition and stimulation. *TRENDS in Plant Science* **11**: 176–183.

Pieterse CMJ, Leon-Reyes A, van der Ent S, van Wees SCM. **2009**. Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nature Chemical Biology* **5**: 308–316.

Planchet E, Gupta KJ, Sonoda M, Kaiser WM. **2005**. Nitric oxide emission from tobacco leaves and cell suspensions: Rate limiting factors and evidence for the involvement of mitochondrial electron transport. *The Plant Journal* **41**: 732–743.

van de Poel B, van der Straeten D. 2014. 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) in plants: more than just the precursor of ethylene! *Frontiers in Plant Science* **5**: 640.

Ponnamperuma FN. 1972. The Chemistry of Submerged Soils. Advances in Agronomy 24: 29–96.

Poppenberger B, Fujioka S, Soeno K, George GL, Vaistij FE, Hiranuma S, Seto H, Takatsuto S, Adam G,

Yoshida S, et al. 2005. The UGT73C5 of *Arabidopsis thaliana* glucosylates brassinosteroids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**: 15253–15258.

Poschenrieder C, Fernández JA, Rubio L, Pérez L, Terés J, Barceló J. 2018. Transport and use of bicarbonate in plants: Current knowledge and challenges ahead. *International Journal of Molecular Sciences* **19**: 1352.

Price GD, Shelden MC, Howitt SM. 2011. Membrane topology of the cyanobacterial bicarbonate transporter, SbtA, and identification of potential regulatory loops. *Molecular Membrane Biology* **28**: 265–275.

Price GD, Woodger FJ, Badger MR, Howitt SM, Tucker L. 2004. Identification of a SulP-type bicarbonate transporter in marine cyanobacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**: 18228–18233.

Prlić D. **2015**. Small-flowered bittercress, *Cardamine parviflora* L. (Brassicaceae), a new species of the Croatian flora. *Acta Botanica Croatica* **74**: 151–157.

Rai MI, Wang X, Thibault DM, Kim HJ, Bombyk MM, Binder BM, Shakeel SN, Schaller GE. **2015**. The *ARGOS* gene family functions in a negative feedback loop to desensitize plants to ethylene. *BMC Plant Biology* **15**: 157.

Ram PC, Singh BB, Singh AK, Ram P, Singh PN, Singh HP, Boamfa I, Harren F, Santosa E, Jackson MB, *et al.* 2002. Submergence tolerance in rainfed lowland rice: physiological basis and prospects for cultivar improvement through marker-aided breeding. *Field Crops Research* **76**: 131–152.

Ramon M, Dang TVT, Broeckx T, Hulsmans S, Crepin N, Sheen J, Rolland F. **2019**. Default Activation and Nuclear Translocation of the Plant Cellular Energy Sensor SnRK1 Regulate Metabolic Stress Responses and Development. *The Plant Cell* **31**: 1614–1632.

Raskin I, Kende H. **1983**. How Does Deep Water Rice Solve Its Aeration Problem. *Plant Physiology* **72**: 447–454.

Reynoso MA, Kajala K, Bajic M, West DA, Pauluzzi G, Yao AI, Hatch K, Zumstein K, Woodhouse M, Rodriguez-Medina J, *et al.* 2019. Evolutionary flexibility in flooding response circuitry in angiosperms. *Science* 365: 1291–1295.

Riber W, Müller JT, Visser EJW, Sasidharan R, Voesenek LACJ, Mustroph A. **2015**. The *Greening after Extended Darkness1* Is an N-End Rule Pathway Mutant with High Tolerance to Submergence and Starvation. *Plant Physiology* **167**: 1616–1629.

Ridge I. 1987. Ethylene and growth control in amphibious plants. In: Crawford RMM, ed. Plant life in aquatic and amphibious habitats. Oxford, UK: Blackwell Scientific Publications, 53–76.

Ridge I, Amarasinghe I. 1984. Ethylene and growth control in the fringed waterlily (*Nymphoides peltata*): Stimulation of cell division and interaction with buoyant tension in petioles. *Plant Growth Regulation* **2**: 235–249.

Rijnders JGHM, Armstrong W, Darwent MJ, Blom CWPM, Voesenek LACJ. 2000. The role of oxygen in submergence-induced petiole elongation in *Rumex palustris: in situ* measurements of oxygen in petioles of intact plants using micro-electrodes. *New Phytologist* **147**: 497–504.

Rijnders JGHM, Barendse GWM, Blom CWPM, Voesenek LACJ. **1996**. The contrasting role of auxin in submergence-induced petiole elongation in two species from frequently flooded wetlands. *Physiologia Plantarum* **96**: 467–473.

Rijnders JGHM, Yang Y-Y, Kamiya Y, Takahashi N, Barendse GWM, Blom CWPM, Voesenek LACJ. 1997. Ethylene enhances gibberellin levels and petiole sensitivity in flooding-tolerant *Rumex palustris* but not in flooding-intolerant *R. acetosa*. *Planta* **203**: 20–25.

del Río LA, López-Huertas E. 2016. ROS generation in peroxisomes and its role in cell signaling. *Plant and Cell Physiology* **57**: 1364–1376.

Roberts SK. 2006. Plasma membrane anion channels in higher plants and their putative functions in roots. *New Phytologist* **169**: 647–666.

Roberts JKM, Callis J, Jardetzky O, Walbot V, Freeling M. **1984a**. Cytoplasmic acidosis as a determinant of flooding intolerance in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **81**: 6029–6033.

Roberts JKM, Callis J, Wemmer D, Walbot V, Jardetzky O. **1984b**. Mechanisms of cytoplasmic pH regulation in hypoxic maize root tips and its role in survival under hypoxia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **81**: 3379–3383.

Rock CD, Zeevaart JAD. **1991**. The *aba* mutant of *Arabidopsis thaliana* is impaired in epoxy-carotenoid biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88**: 7496–7499.

Rubio L, García D, García-Sánchez MJ, Niell FX, Felle HH, Fernández JA. **2017**. Direct uptake of HCO₃⁻ in the marine angiosperm *Posidonia oceanica* (L.) Delile driven by a plasma membrane H⁺ economy. *Plant, Cell and Environment* **40**: 2820–2830.

Russell EJ, Appleyard A. 1915. The atmosphere of the soil: Its composition and the causes of variation. *The Journal of Agricultural Science* **7**: 1–48.

Saika H, Okamoto M, Miyoshi K, Kushiro T, Shinoda S, Jikumaru Y, Fujimoto M, Arikawa T, Takahashi H, Ando M, *et al.* 2007. Ethylene promotes submergence-induced expression of *OsABA8ox1*, a gene that encodes ABA 8'-hydroxylase in rice. *Plant and Cell Physiology* **48**: 287–298.

Sakuma Y, Maruyama K, Qin F, Osakabe Y, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. 2006. Dual function of an *Arabidopsis* transcription factor DREB2A in water-stress-responsive and heat-stress-responsive gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**: 18822–18827.

Sampedro J, Cosgrove DJ. 2005. The expansin superfamily. Genome Biology 6: 242.

Sand-Jensen K, Frost-Christensen H. **1999**. Plant growth and photosynthesis in the transition zone between land and stream. *Aquatic Botany* **63**: 23–35.

Sand-Jensen K, Gordon DM. **1984**. Differential ability of marine and freshwater macrophytes to utilize HCO₃⁻ and CO₂. *Marine Biology* **80**: 247–253.

Sand-Jensen K, Pedersen MF, Nielsen SL. **1992**. Photosynthetic use of inorganic carbon among primary and secondary water plants in streams. *Freshwater Biology* **27**: 283–293.

Sasaki A, Ahikari M, Ueguchi-Tanaka M, Itoh H, Nishimura A, Swapan D, Ishiyama K, Saito T, Kobayashi M, Khush GS, *et al.* 2002. Green revolution: a mutant gibberellin-synthesis gene in rice. *Nature* **416**: 701.

Sasayama D, Okishio T, Hirano T, Fukayama H, Hatanaka T, Akimoto M, Azuma T. 2018. Internodal elongation under submergence in the Amazonian wild rice species *Oryza glumaepatula*: the growth response is induced by hypoxia but not by ethylene. *Plant Growth Regulation* **85**: 123–132.

Sasidharan R, Bailey-Serres J, Ashikari M, Atwell BJ, Colmer TD, Fagerstedt K, Fukao T, Geigenberger P, Hebelstrup KH, Hill RD, et al. 2017. Community recommendations on terminology and procedures used in flooding and low oxygen stress research. *New Phytologist* **214**: 1403–1407.

Sasidharan R, Hartman S, Liu Z, Martopawiro S, Sajeev N, van Veen H, Yeung E, Voesenek LACJ. 2018. Signal Dynamics and Interactions during Flooding Stress. *Plant Physiology* **176**: 1106–1117.

Sasidharan R, Mustroph A, Boonman A, Akman M, Ammerlaan AMH, Breit T, Schranz ME, Voesenek LACJ, van Tienderen PH. 2013. Root Transcript Profiling of Two *Rorippa* Species Reveals Gene Clusters Associated with Extreme Submergence Tolerance. *Plant Physiology* **163**: 1277–1292.

Sasidharan R, Voesenek LACJ. 2015. Ethylene-Mediated Acclimations to Flooding Stress. *Plant Physiology* 169: 3–12.

Sasidharan R, Voesenek LACJ, Pierik R. 2011. Cell wall modifying proteins mediate plant acclimatization to biotic and abiotic stresses. *Critical Reviews in Plant Sciences* **30**: 548–562.

Sauter M. 2013. Root responses to flooding. Current Opinion in Plant Biology 16: 282–286.

Schaller GE, Kieber JJ. 2002. Ethylene. The Arabidopsis Book/American Society of Plant Biologists 1: e0071.

Schmidt RR, Fulda M, Paul M V., Anders M, Plum F, Weits DA, Kosmacz M, Larson TR, Graham IA, Beemster GTS, et al. 2018. Low-oxygen response is triggered by an ATP-dependent shift in oleoyl-CoA in Arabidopsis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 115: E12101–E12110.

Schmitz AJ, Folsom JJ, Jikamaru Y, Ronald P, Walia H. 2013. *SUB1A*-mediated submergence tolerance response in rice involves differential regulation of the brassinosteroid pathway. *New Phytologist* **198**: 1060–1070.

Schussler EE, Longstreth DJ. 1996. Aerenchyma develops by cell lysis in roots and cell separation in leaf petioles in *Sagittaria lancifolia* (Alismataceae). *American Journal of Botany* **83**: 1266–1273.

Schuster J, Binder S. **2005**. The mitochondrial branched-chain aminotransferase (AtBCAT-1) is capable to initiate degradation of leucine, isoleucine and valine in almost all tissues in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology* **57**: 241–254.

Schwartz SH, Qin X, Zeevaart JAD. **2003**. Elucidation of the Indirect Pathway of Abscisic Acid Biosynthesis by Mutants, Genes, and Enzymes. *Plant Physiology* **131**: 1591–1601.

Schwegler T, Brändle R. **1991**. Ethylenabhängige Wachstums- und Entwicklungsprozesse bei Stecklingen der Brunnenkresse (*Nasturtium officinale* R. Br.). *Botanica Helvetica* **101**: 135–140.

Seo M, Peeters AJM, Koiwai H, Oritani T, Marion-Poll A, Zeevaart JAD, Koornneef M, Kamiya Y, Koshiba T. 2000. The *Arabidopsis* aldehyde oxidase 3 (*AAO3*) gene product catalyzes the final step in abscisic acid biosynthesis in leaves. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97: 12908–12913.

Septiningsih EM, Pamplona AM, Sanchez DL, Neeraja CN, Vergara G V., Heuer S, Ismail AM, Mackill DJ. 2009. Development of submergence-tolerant rice cultivars: the *Sub1* locus and beyond. *Annals of Botany* **103**: 151–160.

Setter TL, Bhekasut P, Greenway H. **2010**. Desiccation of leaves after de-submergence is one cause for intolerance to complete submergence of the rice cultivar IR 42. *Functional Plant Biology* **37**: 1096–1104.

Setter TL, Waters I. 2003. Review of prospects for germplasm improvement for waterlogging tolerance in wheat, barley and oats. *Plant and Soil* **253**: 1–34.

Setter TL, Waters I, Sharma SK, Singh KN, Kulshreshtha N, Yaduvanshi NPS, Ram PC, Singh BN, Rane J, McDonald G, *et al.* 2009. Review of wheat improvement for waterlogging tolerance in Australia and India: The importance of anaerobiosis and element toxicities associated with different soils. *Annals of*

Botany 103: 221–235.

Shabala S. 2011. Physiological and cellular aspects of phytotoxicity tolerance in plants: The role of membrane transporters and implications for crop breeding for waterlogging tolerance. *New Phytologist* **190**: 289–298.

Shimada Y, Fujioka S, Miyauchi N, Kushiro M, Takatsuto S, Nomura T, Yokota T, Kamiya Y, Bishop GJ, Yoshida S. 2001. Brassinosteroid-6-Oxidases from Arabidopsis and Tomato Catalyze Multiple C-6 Oxidations in Brassinosteroid Biosynthesis. *Plant Physiology* **126**: 770–779.

Shimizu-Inatsugi R, Terada A, Hirose K, Kudoh H, Sese J, Shimizu KK. 2017. Plant adaptive radiation mediated by polyploid plasticity in transcriptomes. *Molecular Ecology* 26: 193–207.

Shiono K, Yamauchi T, Yamazaki S, Mohanty B, Imran Malik A, Nagamura Y, Nishizawa NK, Tsutsumi N, Colmer TD, Nakazono M. 2014. Microarray analysis of laser-microdissected tissues indicates the biosynthesis of suberin in the outer part of roots during formation of a barrier to radial oxygen loss in rice (*Oryza sativa*). Journal of Experimental Botany 65: 4795–4806.

Shtein I, Popper ZA, Harpaz-Saad S. 2017. Permanently open stomata of aquatic angiosperms display modified cellulose crystallinity patterns. *Plant Signaling and Behavior* 12: e1339858.

Shukla V, Lombardi L, Iacopino S, Pencik A, Novak O, Perata P, Giuntoli B, Licausi F. 2019. Endogenous Hypoxia in Lateral Root Primordia Controls Root Architecture by Antagonizing Auxin Signaling in *Arabidopsis*. *Molecular Plant* **12**: 538–551.

Shultz RW, Tatineni VM, Hanley-Bowdoin L, Thompson WF. **2007**. Genome-Wide Analysis of the Core DNA Replication Machinery in the Higher Plants Arabidopsis and Rice. *Plant Physiology* **144**: 1697–1714.

Singh S, Mackill DJ, Ismail AM. **2009**. Responses of *SUB1* rice introgression lines to submergence in the field: Yield and grain quality. *Field Crops Research* **113**: 12–23.

Singh HP, Singh BB, Ram PC. 2001. Submergence tolerance of rainfed lowland rice: search for physiological marker traits. *Journal of Plant Physiology* **158**: 883–889.

Skirycz A, Claeys H, De Bodt S, Oikawa A, Shinoda S, Andriankaja M, Maleux K, Eloy NB, Coppens F, Yoo S-D, *et al.* 2011. Pause-and-Stop: The Effects of Osmotic Stress on Cell Proliferation during Early Leaf Development in *Arabidopsis* and a Role for Ethylene Signaling in Cell Cycle Arrest. *The Plant Cell* 23: 1876–1888.

Smith FA, Walker NA. **1980**. Photosynthesis by aquatic plants: Effects of unstirred layers in relation to assimilation of CO_2 and HCO_3^- and to carbon isotopic discrimination. *New Phytologist* **86**: 245–259.

Sohlenkamp C, Shelden M, Howitt S, Udvardi M. **2000**. Characterization of *Arabidopsis* AtAMT2, a novel ammonium transporter in plants. *FEBS Letters* **467**: 273–278.

Sohlenkamp C, Wood CC, Roeb GW, Udvardi MK. **2002**. Characterization of Arabidopsis AtAMT2, a High-Affinity Ammonium Transporter of the Plasma Membrane. *Plant Physiology* **130**: 1788–1796.

Sone C, Sakagami J-I. 2017. Physiological mechanism of chlorophyll breakdown for leaves under complete submergence in rice. *Crop Science* **57**: 2729–2738.

Sosnová M, Klimešová J. **2013**. The effects of flooding and injury on vegetative regeneration from roots: A case study with *Rorippa palustris*. *Plant Ecology* **214**: 999–1006.

Steffens B, Geske T, Sauter M. **2011**. Aerenchyma formation in the rice stem and its promotion by H₂O₂. *New Phytologist* **190**: 369–378.

Steffens B, Kovalev A, Gorb SN, Sauter M. 2012. Emerging Roots Alter Epidermal Cell Fate through

Mechanical and Reactive Oxygen Species Signaling. *The Plant Cell* **24**: 3296–3306.

Steffens B, Steffen-Heins A, Sauter M. **2013**. Reactive oxygen species mediate growth and death in submerged plants. *Frontiers in Plant Science* **4**: 179.

Stepanova AN, Robertson-Hoyt J, Yun J, Benavente LM, Xie D-Y, Doležal K, Schlereth A, Jürgens G, Alonso JM. 2008. TAA1-mediated auxin biosynthesis is essential for hormone crosstalk and plant development. *Cell* **133**: 177–191.

Stift M, Luttikhuizen PC, Visser EJW, van Tienderen PH. **2008**. Different flooding responses in *Rorippa amphibia* and *Rorippa sylvestris*, and their modes of expression in F₁ hybrids. *New Phytologist* **180**: 229–239.

Summers JE, Jackson MB. **1994**. Anaerobic conditions strongly promote extension by stems of overwintering tubers of *Potamogeton pectinatus* L. *Journal of Experimental Botany* **45**: 1309–1318.

Sun T. 2008. Gibberellin Metabolism, Perception and Signaling Pathways in Arabidopsis. *The Arabidopsis Book/American Society of Plant Biologists* **6**: e0103.

Sun T, Kamiya Y. 1994. The Arabidopsis GA1 Locus Encodes the Cyclase ent-Kaurene Synthetase A of Gibberellin Biosynthesis. *The Plant Cell* **6**: 1509–1518.

Szekeres M, Németh K, Koncz-Kálmán Z, Mathur J, Kauschmann A, Altmann T, Rédei GP, Nagy F, Schell J, Koncz C. 1996. Brassinosteroids Rescue the Deficiency of CYP90, a Cytochrome P450, Controlling Cell Elongation and De-etiolation in Arabidopsis. *Cell* **85**: 171–182.

Takano J, Noguchi K, Yasumori M, Kobayashi M, Gajdos Z, Miwa K, Hayashi H, Yoneyama T, Fujiwara T. 2002. *Arabidopsis* boron transporter for xylem loading. *Nature* **420**: 337–340.

Takeuchi J, Okamoto M, Mega R, Kanno Y, Ohnishi T, Seo M, Todoroki Y. **2016**. Abscinazole-E3M, a practical inhibitor of abscisic acid 8'-hydroxylase for improving drought tolerance. *Scientific Reports* **6**: 37060.

Tamang BG, Fukao T. 2015. Plant adaptation to multiple stresses during submergence and following desubmergence. *International Journal of Molecular Sciences* **16**: 30164–30180.

Tanaka H, Dhonukshe P, Brewer PB, Friml J. 2006. Spatiotemporal asymmetric auxin distribution: a means to coordinate plant development. *Cellular and Molecular Life Sciences* **63**: 2738–2754.

Tanaka A, Mulleriyawa RP, Yasu T. 1968. Possibility of hydrogen sulfide induced iron toxicity of the rice plant. *Soil Science and Plant Nutrition* **14**: 1–6.

Tao Y, Ferrer J-L, Ljung K, Pojer F, Hong F, Long JA, Li L, Moreno JE, Bowman ME, Ivans LJ, et al. 2008. Rapid synthesis of auxin via a new tryptophan-dependent pathway is required for shade avoidance in plants. *Cell* **133**: 164–176.

Tester M, Langridge P. 2010. Breeding technologies to increase crop production in a changing world. *Science* **327**: 818–822.

Thomas SG, Phillips AL, Hedden P. 1999. Molecular cloning and functional expression of gibberellin 2oxidases, multifunctional enzymes involved in gibberellin deactivation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**: 4698–4703.

Thomma BPHJ, Nelissen I, Eggermont K, Broekaert WF. **1999**. Deficiency in phytoalexin production causes enhanced susceptibility of *Arabidopsis thaliana* to the fungus *Alternaria brassicicola*. *The Plant Journal* **19**: 163–171.

Thomson K-S, Hertel R, Müller S, Tavares JE. **1973**. 1-N-naphthylphthalamic acid and 2,3,5-triiodobenzoic acid. *Planta* **109**: 337–352.
Thurtle-Schmidt BH, Stroud RM. **2016**. Structure of Bor1 supports an elevator transport mechanism for SLC4 anion exchangers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **113**: 10542–10546.

Toki S, Hara N, Ono K, Onodera H, Tagiri A, Oka S, Tanaka H. 2006. Early infection of scutellum tissue with *Agrobacterium* allows high-speed transformation of rice. *The Plant Journal* **47**: 969–976.

Tonfack LB, Moummou H, Latche A, Youmbi E, Benichou M, Pech J-C, van der Rest B. **2011**. The plant SDR superfamily: Involvement in primary and secondary metabolism. *Current Topics in Plant Biology* **12**: 41–53.

Townsley BT, Covington MF, Ichihashi Y, Zumstein K, Sinha NR. 2015. BrAD-seq: Breath Adapter Directional sequencing: a streamlined, ultra-simple and fast library preparation protocol for strand specific mRNA library construction. *Frontiers in Plant Science* **6**: 366.

Tsuji H, Saika H, Tsutsumi N, Hirai A, Nakazono M. **2006**. Dynamic and reversible changes in histone H3-Lys4 methylation and H3 acetylation occurring at submergence-inducible genes in rice. *Plant and Cell Physiology* **47**: 995–1003.

Uehara S, Adachi F, Ito-Inaba Y, Inaba T. **2016**. Specific and efficient targeting of cyanobacterial bicarbonate transporters to the inner envelope membrane of chloroplasts in *Arabidopsis*. *Frontiers in Plant Science* **7**: 16.

Uehlein N, Lovisolo C, Siefritz F, Kaldenhoff R. **2003**. The tobacco aquaporin NtAQP1 is a membrane CO₂ pore with physiological functions. *Nature* **425**: 734–737.

Uku J, Beer S, Björk M. **2005**. Buffer sensitivity of photosynthetic carbon utilisation in eight tropical seagrasses. *Marine Biology* **147**: 1085–1090.

United Nations, Department of Economic and Social Affairs, Population Division 2019. *World Population Prospects 2019: Highlights* (ST/ESA/SER.A/423).

Usadel B, Bläsing OE, Gibon Y, Retzlaff K, Höhne M, Günther M, Stitt M. **2008**. Global Transcript Levels Respond to Small Changes of the Carbon Status during Progressive Exhaustion of Carbohydrates in Arabidopsis Rosettes. *Plant Physiology* **146**: 1834–1861.

Vandepoele K, Raes J, De Veylder L, Rouzé P, Rombauts S, Inzé D. 2002. Genome-Wide Analysis of Core Cell Cycle Genes in Arabidopsis. *The Plant Cell* 14: 903–916.

Varshavsky A. **2011**. The N-end rule pathway and regulation by proteolysis. *Protein Science* **20**: 1298–1345.

Varshavsky A. 2019. N-degron and C-degron pathways of protein degradation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **116**: 358–366.

Vashisht D, Hesselink A, Pierik R, Ammerlaan JMH, Bailey-Serres J, Visser EJW, Pedersen O, van Zanten M, Vreugdenhil D, Jamar DCL, *et al.* 2011. Natural variation of submergence tolerance among *Arabidopsis thaliana* accessions. *New Phytologist* **190**: 299–310.

van Veen H, Akman M, Jamar DCL, Vreugdenhil D, Kooiker M, van Tienderen P, Voesenek LACJ, Schranz ME, Sasidharan R. 2014. Group VII Ethylene Response Factor diversification and regulation in four species from flood-prone environments. *Plant, Cell and Environment* **37**: 2421–2432.

van Veen H, Mustroph A, Barding GA, Vergeer-van Eijk M, Welschen-Evertman RAM, Pedersen O, Visser EJW, Larive CK, Pierik R, Bailey-Serres J, *et al.* 2013. Two *Rumex* Species from Contrasting Hydrological Niches Regulate Flooding Tolerance through Distinct Mechanisms. *The Plant Cell* 25: 4691–4707.

van Veen H, Vashisht D, Akman M, Girke T, Mustroph A, Reinen E, Hartman S, Kooiker M, van

Tienderen P, Schranz ME, et al. 2016. Transcriptomes of Eight *Arabidopsis thaliana* Accessions Reveal Core Conserved, Genotype- and Organ-Specific Responses to Flooding Stress. *Plant Physiology* **172**: 668–689.

Velásquez AC, Castroverde CDM, He SY. 2018. Plant–Pathogen Warfare under Changing Climate Conditions. *Current Biology* **28**: R619–R634.

Verboven P, Pedersen O, Ho QT, Nicolai BM, Colmer TD. **2014**. The mechanism of improved aeration due to gas films on leaves of submerged rice. *Plant, Cell and Environment* **37**: 2433–2452.

Ververidis P, John P. 1991. Complete recovery *in vitro* of ethylene-forming enzyme activity. *Phytochemistry* **30**: 725–727.

Vervuren PJA, Beurskens SMJH, Blom CWPM. **1999**. Light acclimation, CO₂ response and long-term capacity of underwater photosynthesis in three terrestrial plant species. *Plant, Cell and Environment* **22**: 959–968.

Vervuren PJA, Blom CWPM, de Kroon H. 2003. Extreme flooding events on the Rhine and the survival and distribution of riparian plant species. *Journal of Ecology* **91**: 135–146.

Vicente J, Mendiondo GM, Pauwels J, Pastor V, Izquierdo Y, Naumann C, Movahedi M, Rooney D, Gibbs DJ, Smart K, *et al.* 2019. Distinct branches of the N-end rule pathway modulate the plant immune response. *New Phytologist* 221: 988–1000.

Visser EJW, Cohen JD, Barendse GWM, Blom CWPM, Voesenek LACJ. **1996**. An Ethylene-Mediated Increase in Sensitivity to Auxin Induces Adventitious Root Formation in Flooded *Rumex palustris* Sm. *Plant Physiology* **112**: 1687–1692.

Visser EJW, Colmer TD, Blom CWPM, Voesenek LACJ. **2000**. Changes in growth, porosity, and radial oxygen loss from adventitious roots of selected mono- and dicotyledonous wetland species with contrasting types of aerenchyma. *Plant, Cell and Environment* **23**: 1237–1245.

Voesenek LACJ, Banga M, Thier RH, Mudde CM, Harren FJM, Barendse GWM, Blom CWPM. **1993**. Submergence-Induced Ethylene Synthesis, Entrapment, and Growth in Two Plant Species with Contrasting Flooding Resistances. *Plant Physiology* **103**: 783–791.

Voesenek LACJ, Colmer TD, Pierik R, Millenaar FF, Peeters AJM. **2006**. How plants cope with complete submergence. *New Phytologist* **170**: 213–226.

Voesenek LACJ, Perik PJM, Blom CWPM, Sassen MMA. 1990. Petiole elongation in *Rumex* species during submergence and ethylene exposure: The relative contributions of cell division and cell expansion. *Journal of Plant Growth Regulation* **9**: 13–17.

Voesenek LACJ, Rijnders JHGM, Peeters AJM, van de Steeg HM, de Kroon H. 2004. Plant hormones regulate fast shoot elongation under water: From genes to communities. *Ecology* **85**: 16–27.

Voesenek LACJ, van der Veen R. 1994. The role of phytohormones in plant stress: too much or too little water. *Acta Botanica Neerlandica* **43**: 91–127.

Voesenek LACJ, van Veen H, Sasidharan R. **2014**. Learning from nature: The use of non-model species to identify novel acclimations to flooding stress. *AoB PLANTS* **6**: 1–6.

Voesenek LACJ, Vriezen WH, Smekens MJE, Huitink FHM, Bögemann GM, Blom CWPM. 1997. Ethylene Sensitivity and Response Sensor Expression in Petioles of *Rumex* Species at Low O₂ and High CO₂ Concentrations. *Plant Physiology* **114**: 1501–1509.

Voutsina N, Payne AC, Hancock RD, Clarkson GJ, Rothwell SD, Chapman MA, Taylor G. 2016. Characterization of the watercress (*Nasturtium officinale* R. Br.; Brassicaceae) transcriptome using RNASeq and identification of candidate genes for important phytonutrient traits linked to human health. BMC Genomics 17: 378.

Vreeburg RAM, Benschop JJ, Peeters AJM, Colmer TD, Ammerlaan AHM, Staal M, Elzenga TM, Staals RHJ, Darley CP, McQueen-Mason SJ, *et al.* 2005. Ethylene regulates fast apoplastic acidification and expansin A transcription during submergence-induced petiole elongation in *Rumex palustris*. *The Plant Journal* **43**: 597–610.

Vriezen WH, De Graaf B, Mariani C, Voesenek LACJ. **2000**. Submergence induces expansin gene expression in flooding-tolerant *Rumex palustris* and not in flooding-intolerant *R. acetosa*. *Planta* **210**: 956–963.

Wang Y, Spalding MH. **2014**. Acclimation to Very Low CO₂: Contribution of Limiting CO₂ Inducible Proteins, LCIB and LCIA, to Inorganic Carbon Uptake in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology* **166**: 2040–2050.

Wang H, Zhou Y, Gilmer S, Whitwill S, Fowke LC. **2000**. Expression of the plant cyclin-dependent kinase inhibitor ICK1 affects cell division, plant growth and morphology. *The Plant Journal* **24**: 613–623.

Warrier RR, Lalitha S, Savitha C. 2014. A modified assay of carbonic anhydrase activity in tree species. *BBR - Biochemistry and Biotechnology Reports* **3**: 48–55.

Watanabe K, Nishiuchi S, Kulichikhin K, Nakazono M. 2013. Does suberin accumulation in plant roots contribute to waterlogging tolerance? *Frontiers in Plant Science* **4**: 178.

Weber M, Harada E, Vess C, Roepenack-Lahaye E V., Clemens S. 2004. Comparative microarray analysis of *Arabidopsis thaliana* and *Arabidopsis halleri* roots identifies nicotianamine synthase, a ZIP transporter and other genes as potential metal hyperaccumulation factors. *The Plant Journal* **37**: 269–281.

Weber M, Trampczynska A, Clemens S. 2006. Comparative transcriptome analysis of toxic metal responses in *Arabidopsis thaliana* and the Cd²⁺-hypertolerant facultative metallophyte *Arabidopsis halleri*. *Plant, Cell and Environment* **29**: 950–963.

Weits DA, Giuntoli B, Kosmacz M, Parlanti S, Hubberten H-M, Riegler H, Hoefgen R, Perata P, van Dongen JT, Licausi F. 2014. Plant cysteine oxidases control the oxygen-dependent branch of the N-end-rule pathway. *Nature Communications* 5: 3425.

Weits DA, Kunkowska AB, Kamps NCW, Portz KMS, Packbier NK, Nemec Venza Z, Gaillochet C, Lohmann JU, Pedersen O, van Dongen JT, *et al.* 2019. An apical hypoxic niche sets the pace of shoot meristem activity. *Nature* 569: 714–717.

Wells CL, Pigliucci M. **2000**. Adaptive phenotypic plasticity: The case of heterophylly in aquatic plants. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* **3**: 1–18.

White MD, Kamps JJAG, East S, Taylor Kearney LJ, Flashman E. 2018. The plant cysteine oxidases from *Arabidopsis thaliana* are kinetically tailored to act as oxygen sensors. *Journal of Biological Chemistry* 293: 11786–11795.

White MD, Klecker M, Hopkinson RJ, Weits DA, Mueller C, Naumann C, O'Neill R, Wickens J, Yang J, Brooks-Bartlett JC, *et al.* 2017. Plant cysteine oxidases are dioxygenases that directly enable arginyl transferase-catalysed arginylation of N-end rule targets. *Nature Communications* 8: 14690.

Wilbur KM, Anderson NG. 1948. Electrometric and colorimetric determination of carbonic anhydrase. *Journal of Biological Chemistry* **176**: 147–154.

Winkel A, Colmer TD, Ismail AM, Pedersen O. **2013**. Internal aeration of paddy field rice (*Oryza sativa*) during complete submergence - importance of light and floodwater O₂. *New Phytologist* **197**: 1193–1203.

Winkel A, Pedersen O, Ella E, Ismail AM, Colmer TD. 2014. Gas film retention and underwater photosynthesis during field submergence of four contrasting rice genotypes. *Journal of Experimental Botany* 65: 3225–3233.

von Wirén N, Gazzarrini S, Gojon A, Frommer WB. 2000. The molecular physiology of ammonium uptake and retrieval. *Current Opinion in Plant Biology* **3**: 254–261.

Xu K, Xu X, Fukao T, Canlas P, Maghirang-Rodriguez R, Heuer S, Ismail AM, Bailey-Serres J, Ronald PC, Mackill DJ. 2006. *Sub1A* is an ethylene-response-factor-like gene that confers submergence tolerance to rice. *Nature* 442: 705–708.

Yamaguchi S. 2008. Gibberellin Metabolism and its Regulation. *Annual Review of Plant Biology* 59: 225–251.

Yamaguchi S, Sun T, Kawaide H, Kamiya Y. **1998**. The *GA2* Locus of *Arabidopsis thaliana* Encodes ent-Kaurene Synthase of Gibberellin Biosynthesis. *Plant Physiology* **116**: 1271–1278.

Yamano T, Sato E, Iguchi H, Fukuda Y, Fukuzawa H. 2015. Characterization of cooperative bicarbonate uptake into chloroplast stroma in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **112**: 7315–7320.

Yamauchi T, Watanabe K, Fukazawa A, Mori H, Abe F, Kawaguchi K, Oyanagi A, Nakazono M. 2014. Ethylene and reactive oxygen species are involved in root aerenchyma formation and adaptation of wheat seedlings to oxygen-deficient conditions. *Journal of Experimental Botany* **65**: 261–273.

Yang Y, Hammes UZ, Taylor CG, Schachtman DP, Nielsen E. 2006. High-affinity auxin transport by the AUX1 influx carrier protein. *Current Biology* **16**: 1123–1127.

Yang SF, Hoffman NE. **1984**. Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology* **35**: 155–189.

Yang J, Ye Z. **2009**. Metal accumulation and tolerance in wetland plants. *Frontiers of Biology in China* **4**: 282–288.

Yeung E, Bailey-Serres J, Sasidharan R. 2019. After The Deluge: Plant Revival Post-Flooding. *Trends in Plant Science* 24: 443–454.

Yeung E, van Veen H, Vashisht D, Paiva ALS, Hummel M, Rankenberg T, Steffens B, Steffen-Heins A, Sauter M, de Vries M, et al. 2018. A stress recovery signaling network for enhanced flooding tolerance in Arabidopsis thaliana. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 115: E6085–E6094.

Yokoyama R, Nishitani K. 2001. A comprehensive expression analysis of all members of a gene family encoding cell-wall enzymes allowed us to predict *cis*-regulatory regions involved in cell-wall construction in specific organs of Arabidopsis. *Plant and Cell Physiology* **42**: 1025–1033.

Yoshida T, Sakuma Y, Todaka D, Maruyama K, Qin F, Mizoi J, Kidokoro S, Fujita Y, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. 2008. Functional analysis of an *Arabidopsis* heat-shock transcription factor *HsfA3* in the transcriptional cascade downstream of the DREB2A stress-regulatory system. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 368: 515–521.

Young MD, Wakefield MJ, Smyth GK, Oshlack A. **2010**. Gene ontology analysis for RNA-seq: accounting for selection bias. *Genome Biology* **11**: R14.

Zabalza A, van Dongen JT, Froehlich A, Oliver SN, Faix B, Gupta KJ, Schmälzlin E, Igal M, Orcaray L, Royuela M, *et al.* 2009. Regulation of Respiration and Fermentation to Control the Plant Internal Oxygen Concentration. *Plant Physiology* **149**: 1087–1098.

Zeng F, Shabala L, Zhou M, Zhang G, Shabala S. 2013. Barley responses to combined waterlogging and

salinity stress: Separating effects of oxygen deprivation and elemental toxicity. *Frontiers in Plant Science* **4**: 313.

Zhang Z, Ren J-S, Clifton IJ, Schofield CJ. **2004**. Crystal structure and mechanistic implications of 1aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase—the ethylene-forming enzyme. *Chemistry & Biology* **11**: 1383–1394.

Zhao Y. 2014. Auxin Biosynthesis. The Arabidopsis Book/American Society of Plant Biologists 12: e0173.

6. Anhang

6.1 Abbildungen



Abb. A1 Strategieexperiment von *Cardamine pratensis* und *Rorippa amphibia*. Etwa 3-4 Wochen-alte *C. pratensis* (a)- und *R. amphibia* (b)-Pflanzen wurden unter Kurztagbedingungen überflutet (schwarz), als Kontrolle (weiß) dienten Pflanzen, welche weiter unter Kurztagbedingungen kultiviert wurden. Zu Beginn des Experiments und nach 7 d (a) und 3 d (b) wurden die Länge von Petiole und Lamina der zwei jüngsten Blätter gemessen. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM mit n= 8 aus zwei biologischen Replikaten (a) und n= 12 aus einem Experiment (b). Signifikante Unterschiede zwischen Kontrolle und Überflutung sind gekennzeichnet durch ***, P < 0,001, ns = nicht signifikant (zweifaktorielle ANOVA mit P < 0,05, Sidak Test).



Abb. A2 Escape-Strategie bei Nasturtium officinale. Etwa 3-4 Wochen-alte Pflanzen wurden unter Kurztagbedingungen überflutet. Nach mehrwöchiger Überflutungsdauer erreichten die Pflanzen die Wasseroberfläche.

(a) A. thaliana - 3,5 w Überflutung



(b) C. hirsuta - 8 w Überflutung



(d) R. palustris - 10 w Überflutung

(c) C. pratensis - 10 w Überflutung



(e) R. sylvestris - 10 w Überflutung



Abb. A3 Überlebensexperiment nach Überflutung. (a)-(e): Die Pflanzen wurden für den angegebenen Zeitraum [w, Wochen] überflutet. Die Bilder zeigen die Pflanzen direkt nach der Überflutung. Nach etwa 2 Wochen Regenerationszeit wurde das Überleben des Sprossmeristems durch die Bildung neuer Blätter bestimmt (siehe Abb. 9). Skala entspricht 2 cm.



Abb. A4 Zugabe von Saccharose zum Überflutungswasser erhöht das Unterwasser-Wachstum. Pflanzen wurden unter Kurztagbedingungen entweder in normalem Leitungswasser (Ü) oder in Leitungswasser mit 1 % (w/v) Saccharose (Sacch) überflutet. Als Kontrolle (K) dienten Pflanzen, welche weiter unter Kurztagbedingungen kultiviert wurden. Die Länge des Stängels und die Länge der Petiole des jüngsten Blattes wurde vor und nach 24 h Behandlung gemessen. Das Wachstum [mm] entspricht der Differenz. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM mit n= 12 aus einem Experiment. Unterschiedliche Buchstaben repräsentieren signifikante Unterschiede mit *P* < 0,05 (einfaktorielle ANOVA mit Tukey's HSD Test).



Abb. A5 Dosisabhängiger Einfluss von GA₃ **auf die Wachstumsreaktionen bei Überflutung.** Die Pflanzen wurden mit 100 μ M Paclobutrazol (PAC) oder mock-Lösung (0,01 % (v/v) Ethanol) vorbehandelt und anschließend entweder in Wasser mit 0,01 % (v/v) Ethanol oder verschiedenen GA₃-Konzentrationen überflutet. Die Länge des Stängels und die Länge der Petiole des jüngsten Blattes wurde vor und nach 24 h Behandlung gemessen. Das Wachstum [mm] entspricht der Differenz. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM mit n= 10 aus einem Experiment. Unterschiedliche Buchstaben repräsentieren signifikante Unterschiede mit *P* < 0,05 (zweifaktorielle ANOVA mit Tukey's HSD Test).



Abb. A6 Messung der internen O₂-Konzentration. (a) zeigt die Größe der Pflanzen. (b) Versuchsaufbau. (c) Position der beiden O₂-Mikrosensoren im Stängel- und Petiolengewebe. (d) Nahaufnahme der O₂-Mikrosensoren in der Petiole des 5. Blattes (links) und dem Stängel (rechts). Der O₂ -Mikrosensor wurde 550–600 μm in das Stängelgewebe und 200–225 μm in das Petiolengewebe positioniert. Alle Fotos stammen von Ole Pedersen, Universität Kopenhagen, Dänemark.



Abb. A7 Zusammenhang zwischen Zuckerverfügbarkeit und Induktion von Kohlenhydratmangel-Markergenen. Dargestellt ist die Summe der Zuckerkonzentrationen (Abb. 32b) nach 1 d bzw. 2 d Überflutung in Relation zur Anzahl der induzierten Kohlenhydratmangel-Markergene nach 1 d bzw. 2 d Überflutung (Tab. 10).

(a)

1d	2d	AGI	Annotation											
NA		Х	AT1G01590.1	FRO1	-3	0	3 log ₂ FC							
Х				х	Х	NA	NA	NA	NA	AT1G01580.1	FRO2			0-
		Х		NA	NA	NA	NA	NA	NA	AT1G23020.2	FRO3			
	Х	NA	AT1G23020.3	FRO3										
		NA	AT1G23020.4	FRO3										
		NA	AT1G23020.5	FRO3										
	X			NA	NA	NA	NA	NA	NA	AT1G23020.6	FRO3			
X		NA	NA	NA	NA	NA	NA	х	х	AT1G23020.7	FRO3			
NA	NA	Х	Х	NA	NA	NA	NA	NA	NA	AT5G23980.1	FRO4			
NA	NA	Х	X	NA	NA	NA	NA	NA	NA	AT5G23990.1	FRO5			
								Х	×	AT5G49730.1	FRO6			
		NA	NA	Х	X	NA	NA	NA	NA	AT5G49730.2	FRO6			
		NA	AT5G49740.1	FR07										
		NA	AT5G49740.2	FR07										
				NA	NA	NA	NA	Х	×	AT5G49740.3	FR07			
X	x	Х		×	x	NA	NA	X	×	AT5G50160.1	FRO8			
X		NA	NA	×	X	NA	NA	X	×	AT5G50160.2	FRO8			

(b)

A. thaliana C. hirsuta C. pratensis R. palustris R. sy	ylvestris
--	-----------

	1d	2d	AGI	Annotation												
	Х	Х	Х		Х	Х			Х	Х	AT2G36910.1	ABCB1	-3	0	3	log₂FC
		X	NA	AT2G47000.2	ABCB4				-							
	Х	Х			NA	NA	NA	NA	NA	NA	AT2G47000.3	ABCB4				
	Х		NA	AT2G47000.5	ABCB4											
	NA	NA			NA	NA	NA	NA	NA	NA	AT2G47000.6	ABCB4				
					NA	NA	Х	Х	NA	NA	AT2G47000.7	ABCB4				
		х	х		х			х	Х	х	AT3G28860.1	ABCB19				
1			NA	AT3G62150.1	ABCB21											
			Х	Х	NA	NA	NA	NA	NA	NA	AT3G62150.2	ABCB21				
	NA	NA			NA	NA					AT3G62150.3	ABCB21				
	NA	NA	х	X	NA	NA	NA	NA	NA	NA	AT5G57090.2	EIR1				
					х	Х			х	х	AT1G23080.1	PIN7				
			Х		NA	NA	NA	NA	NA	NA	AT1G23080.2	PIN7				
			NA	NA	Х	Х	NA	NA	NA	NA	AT1G23080.3	PIN7				
	NA	NA			NA	NA		Х	NA	NA	AT1G23080.4	PIN7				

Abb. A8 Expressionsanalyse von FRO-Genen (a) und Auxin-Efflux-Transporter-Genen (b). Heatmap zeigt den log₂FC nach 1 d und 2 d Überflutung. Gelb repräsentiert induzierte und Cyan reprimierte Gene, Schwarz entspricht Genen, die weder induziert noch reprimiert sind (siehe log₂FC-Skala). Gene mit einem P_{adi}> 0,05 sind durch ein "x" gekennzeichnet. Dargestellt sind AGI-Gencodes der GO-Kategorien GO:0000293 (a) und GO:0010329 (b). NA: nicht im Datensatz exprimiert.

A. tha	aliana	C. hii	rsuta	C. pra	tensis	R. pal	ustris	R. sylv	vestris						
1d	2d	1d	2d	1d	2d	1d	2d	1d	2d	AGI	Annotation				
	Х	NA	NA	Х	Х					AT1G72360.1	HRE1	-3	0	3	log₂FC
	Х	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	AT1G72360.2	HRE1				0-
Х	Х		Х	NA	NA					AT1G72360.3	HRE1				
Х	х		Х	х		х	х			AT2G47520.1	HRE2				

Abb. A9 Expressionsanalyse von HRE1 und HRE2. Heatmap zeigt den log₂FC nach 1 d und 2 d Überflutung. Gelb repräsentiert induzierte und Cyan reprimierte Gene, Schwarz entspricht Genen, die weder induziert noch reprimiert sind (siehe log₂FC-Skala). Gene mit einem Padj> 0,05 sind durch ein "x" gekennzeichnet. Dargestellt sind AGI-Gencodes der GO-Kategorie GO:0034059. NA: nicht im Datensatz exprimiert.

A. tha	aliana	C. hii	rsuta	C. pra	tensis	R. pal	ustris	R. sylv	/estris						
1d	2d	1d	2d	1d	2d	1d	2d	1d	2d	AGI	Annotation				
										AT4G13510.1	AMT1;1	-3	0	3	log₂FC
х		Х	Х	NA	NA	NA	NA	NA	NA	AT1G64780.1	AMT1;2				-
Х	Х	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	AT4G28700.1	AMT1;4				
NA	NA	NA	NA	Х	Х	NA	NA	NA	NA	AT3G24290.1	AMT1;5				
Х		Х								AT2G38290.1	AMT2				
Х	Х	X	Х	Х						AT2G38290.2	AMT2				

Abb. A10 Expressionsanalyse von Ammoniumtransporter-Genen. Heatmap zeigt den log₂FC nach 1 d und 2 d Überflutung. Gelb repräsentiert induzierte und Cyan reprimierte Gene, Schwarz entspricht Genen, die weder induziert noch reprimiert sind (siehe log₂FC-Skala). Gene mit einem P_{adi}> 0,05 sind durch ein "x" gekennzeichnet. Dargestellt sind AGI-Gencodes der GO-Kategorien GO:0008519 und GO:0015695. NA: nicht im Datensatz exprimiert.

(a) A. thaliana

1d	2d	Transkript	AGI	Annotation
		AT3G52720.1	AT3G52720	ACA1
Х		AT3G52720.2	AT3G52720	ACA1
		AT3G52720.4	AT3G52720	ACA1
		AT2G28210.1	AT2G28210	ACA2
		AT5G04180.1	AT5G04180	ACA3
	Х	AT3G01500.2	AT3G01500	CA1
	Х	AT5G14740.6	AT5G14740	CA2
		AT5G14740.7	AT5G14740	CA2
	Х	AT5G14740.9	AT5G14740	CA2
Х		AT1G58180.1	AT1G58180	BCA6
		AT1G58180.3	AT1G58180	BCA6
		AT1G58180.4	AT1G58180	BCA6
		AT1G58180.5	AT1G58180	BCA6
		AT1G58180.6	AT1G58180	BCA6
		AT1G58180.7	AT1G58180	BCA6
		AT1G19580.1	AT1G19580	GAMMA CA1
	Х	AT1G19580.2	AT1G19580	GAMMA CA1
		AT5G66510.1	AT5G66510	GAMMA CA3
Х		AT5G63510.1	AT5G63510	GAMMA CAL1
		AT3G48680.1	AT3G48680	GAMMA CAL2

(c) C. pratensis

1d	2d	Transkript	AGI	Annotation
Х		TRINITY_DN43684_c2_g3_i3	AT3G52720	ACA1
		TRINITY_DN31325_c0_g1_i3	AT1G23730	BCA3
		TRINITY_DN50656_c3_g1_i1	AT1G23730	BCA3
		TRINITY_DN50656_c3_g1_i3	AT1G23730	BCA3
	Х	TRINITY_DN40325_c0_g1_i2	AT1G58180	BCA6
	х	TRINITY_DN40325_c0_g1_i6	AT1G58180	BCA6
Х		TRINITY_DN44418_c2_g3_i2	AT3G48680	GAMMA CAL2

(e) R. sylvestris

1d	2d	Transkript	AGI	Annotation
X		TRINITY_DN32220_c0_g1_i8	AT3G52720	ACA1
	Х	TRINITY_DN35346_c2_g1_i3	AT3G52720	ACA1
	Х	TRINITY_DN39699_c1_g4_i2	AT3G52720	ACA1
		TRINITY_DN40404_c0_g4_i1	AT3G01500	CA1
		TRINITY_DN40404_c0_g4_i2	AT3G01500	CA1
		TRINITY_DN40404_c0_g4_i3	AT3G01500	CA1
		TRINITY_DN40404_c0_g4_i4	AT3G01500	CA1
		TRINITY_DN30558_c0_g1_i2	AT5G14740	CA2
		TRINITY_DN30558_c0_g2_i1	AT5G14740	CA2
		TRINITY_DN32185_c1_g1_i1	AT5G14740	CA2
		TRINITY_DN33852_c1_g1_i2	AT5G14740	CA2
	Х	TRINITY_DN33852_c1_g1_i3	AT5G14740	CA2
		TRINITY_DN35049_c0_g1_i10	AT5G14740	CA2
		TRINITY_DN41392_c0_g1_i14	AT1G23730	BCA3
		TRINITY_DN41392_c0_g1_i7	AT1G23730	BCA3
		TRINITY_DN41392_c0_g1_i9	AT1G23730	BCA3
Х		TRINITY_DN33652_c0_g1_i2	AT4G33580	BCA5
		TRINITY_DN36079_c0_g1_i1	AT1G58180	BCA6
X		TRINITY_DN36079_c0_g1_i2	AT1G58180	BCA6
		TRINITY_DN36079_c0_g1_i5	AT1G58180	BCA6
		TRINITY_DN36079_c0_g1_i6	AT1G58180	BCA6
		TRINITY_DN38210_c2_g1_i6	AT1G58180	BCA6

(b) C. hirsuta

1d	2d	Transkript	AGI	Annotation
		Chr5_GG_1154_c1_g1_i1	AT3G52720	ACA1
		Chr5_GG_1154_c4_g1_i1	AT3G52720	ACA1
		Chr4_GG_1626_c0_g1_i1	AT2G28210	ACA2
	Х	Chr2_GG_1962_c1_g1_i1	AT5G04180	ACA3
	Х	Chr6_GG_2389_c0_g1_i1	AT5G04180	ACA3
		Chr7_GG_981_c1_g1_i1	AT4G20990	ACA4
		Chr1_GG_1585_c0_g1_i1	AT1G08080	ACA7
		Chr3_GG_551_c1_g1_i1	AT3G01500	CA1
		Chr3_GG_551_c2_g1_i1	AT3G01500	CA1
Х		Chr6_GG_2019_c0_g1_i1	AT5G14740	CA2
		Chr6_GG_2019_c1_g1_i2	AT5G14740	CA2
	Х	Chr6_GG_2019_c3_g1_i1	AT5G14740	CA2
х		Chr6_GG_2019_c5_g1_i1	AT5G14740	CA2
	Х	Chr2_GG_460_c1_g1_i1	AT1G70410	BCA4
Х		Chr7_GG_1165_c0_g1_i1	AT4G33580	BCA5
		Chr2_GG_400_c0_g1_i1	AT1G58180	BCA6
		Chr2_GG_400_c0_g1_i2	AT1G58180	BCA6
		Chr1_GG_191_c0_g1_i1	AT1G19580	GAMMA CA1
Х		Chr1_GG_2200_c1_g1_i1	AT1G47260	GAMMA CA2
Х		Chr8_GG_1580_c1_g1_i1	AT5G66510	GAMMA CA3
		Chr8_GG_822_c0_g1_i1	AT5G63510	GAMMA CAL1

(d) R. palustris

1d	2d	Transkript	AGI	Annotation
		TRINITY_DN39276_c2_g3_i1	AT3G01500	CA1
		TRINITY_DN31822_c0_g1_i1	AT5G14740	CA2
		TRINITY_DN31822_c0_g1_i11	AT5G14740	CA2
		TRINITY_DN31822_c0_g1_i12	AT5G14740	CA2
Х		TRINITY_DN31822_c0_g1_i14	AT5G14740	CA2
		TRINITY_DN31822_c0_g1_i15	AT5G14740	CA2
		TRINITY_DN31822_c0_g1_i19	AT5G14740	CA2
		TRINITY_DN31822_c0_g1_i8	AT5G14740	CA2
		TRINITY_DN34972_c0_g1_i11	AT5G14740	CA2
		TRINITY_DN34972_c0_g1_i9	AT5G14740	CA2
		TRINITY_DN34972_c0_g2_i5	AT5G14740	CA2
		TRINITY_DN34972_c0_g2_i9	AT5G14740	CA2
		TRINITY_DN38887_c0_g1_i7	AT1G23730	BCA3
Х		TRINITY_DN30963_c1_g1_i3	AT4G33580	BCA5
		TRINITY_DN32388_c0_g1_i1	AT1G58180	BCA6
		TRINITY_DN32388_c0_g1_i4	AT1G58180	BCA6
	Х	TRINITY_DN32388_c0_g1_i9	AT1G58180	BCA6
		TRINITY_DN32388_c0_g2_i1	AT1G58180	BCA6
		TRINITY_DN32388_c0_g2_i8	AT1G58180	BCA6
	Х	TRINITY_DN28648_c0_g3_i1	AT5G66510	GAMMA CA3



Abb. A11 Expression von Carboanhydrase-Gene bei Überflutung. Heatmap zeigt den log_2FC nach 1 d und 2 d Überflutung in *A. thaliana* (a), *C. hirsuta* (b), *C. pratensis* (c), *R. palustris* (d) und *R. sylvestris* (e). Gelb repräsentiert induzierte und Cyan reprimierte Gene, Schwarz entspricht Genen, die weder induziert noch reprimiert sind (siehe log_2FC -Skala; siehe Abb. 42 für eine andere log_2FC -Skala). Gene mit einem $P_{adj} > 0,05$ sind durch ein "x" gekennzeichnet. Gezeigt sind nur Transkripte, die in mindestens einem Zeitpunkt signifikant differenziell exprimiert waren ($P_{adj} < 0,05$).

AtBCA3 RsBCA3	ATGTCGACAGAGTCGTACGAAGACGCCATTAAAAGACTCGGAGAGCTTCTCAGTAAGAAATCGGATCTCGGGAA ATGTCGACGGAGTCGTATGAAGATGCCATTAAAAGACTTGGGGAGCTTCTCAGTAAGAAATCGGAGCTCGGAAA ******** ******** ***** **********
AtBCA3 RsBCA3	CGTGGCAGCCGCAAAGATCAAGAAGTTAACGGATGAGTTAGAGGAACTTGATTCCAACAAGTTAGATGCCGTAG TGTGGCGGCCGCAAAGATCAAGAAACTGACGGATGAGCTAGAGGAACTTGATTCCAACAAGTTGGATGCCGTAG ***** *******************************
AtBCA3 RsBCA3	AACGAATCAAATCCGGATTTCTCCATTTCAAGACTAATAATTATGAGAAGAATCCTACTTTGTACAATTCACTT AACGAATCAAATCCGGCTTTATCCATTTCAAGAAAAATAATTATGAGAAGAATCCTTCTTTGTACAATGCACTA **********************************
AtBCA3 RsBCA3	GCCAAGAGCCAGACCCCCAAGTTTTTGGTGTTTGCTTGTGCGGATTCACGAGTTAGTCCATCTTCACATCTTGAA GCCAAGAGCCAGAGCCCCAAGTTTCTGGTGTTTGCTTGTGCGGATTCACGTGTTTCCCCTTCTCACATATTGAA *******************************
AtBCA3 RsBCA3	TTTCCAACTTGGGGAAGCCTTCATCGTTAGAAACATTGCAAACATGGTGCCACCTTATGACAAGACAAAGCACT TTTTCAACTTGGGGAAGCTTTTATCGTTAGAAACATTGCAAACATGGTGCCACCTTTTGACAAGGTGAAGCACT *** *********************************
AtBCA3 RsBCA3	CTAATGTTGGTGCGGCCCTTGAATATCCAATTACAGTCCTCAACGTGGAGAACATTCTTGTTATTGGACACAGC CTAATGTTGGTGCCGCCCTTGAATATCCAATTACAGTTCTCAACGTGGAGAACATTCTGGTGATTGGTCACAGC *********************************
AtBCA3 RsBCA3	TGTTGTGGTGGAATAAAGGGACTCATGGCCATTGAAGATAATACAGCTCCCACTAAGACCGAGTTCATAGAAAA TGTTGTGGTGGAATAAAGGGACTCATGGCTATTGAAGATGATGCAGCTCCCACTACTGAGTTCATAGAAAA *******************************
AtBCA3 RsBCA3	CTGGATCCAGATCTGTGCACCGGCCAAGAACAGGATCAAGCAGGATTGTAAAGACCTAAGCTTTGAAGATCAGT CTGGATCCAGATCTGTGCACCGGCCAAGAACAGGATCAAGCAGGAATGTAAAGACCTAAGCTTTGACGATCAAT *********************************
AtBCA3 RsBCA3	GCACCAACTGTGAGAAGGAAGCCGTGAACGTGTCCTTGGGGGAATCTTTTGTCTTACCCATTCGTGAGAGAAAGA GCAACAACTGTGAGAAGGAAGCGGTGAACGTGTCCTTGGGGGAATCTATTGTCTTACCCATTCGTGAGAGAAAGA *** *************************
AtBCA3 RsBCA3	GTGGTGAAGAACAAGCTTGCCATAAGAGGAGGTCACTATGATTTCGTAAAAGGAACGTTTGATCTTTGGGAACT GTGGAGAAGAACAAGCTCACCATCAGAGGAGCTCACTACGATTTCGTTAAAGGAACATTTGATCTCTGGGACCT **** *********** **** **************
AtBCA3 RsBCA3	TGACTTCAAGACTACCCCTGCCTTTGCCTTGTCTTAA CGACTACAAGACCACCCCTGCTTTTGCCTTGTCTTAA **** ****** ******** ********

Abb. A12 ClustalW-Alignment der Gensequenzen von *AtBCA3* und *RsBCA3*. Die CDS von *AtBCA3* wurde durch araport.org erhalten. Die CDS von *RsBCA3* entspricht der durch Amplifizierung der *R. sylvestris* cDNA mittels der in Tab. A1 dargestellten Primer und der in den pMDC43-HA Vektor klonierten Sequenz. Konservierte Bereiche sind mit "*" gekennzeichnet.



Abb. A13 Nachweis der BCA3-Überexpression im Col-0-Hintergrund. Dargestellt ist der Transkriptnachweis von (a) *AtBCA3*und (b) *RsBCA3*-Überexpressionslinien mittels semi-quantitativer PCR sowie der Proteinnachweis mittels Western-Blot (c) von 7 d-alten Keimlingen. Der Nachweis der Überexpression erfolgte mit genspezifischen Primern (Tab. A1), *AtTUB* Expression dient als Referenz des Transkriptlevels und *hph*-Expression als Nachweis der Hygromycin-Resistenz. Die Zyklenzahl betrug 32 (a) bzw. 30 (b). (c) Die Detektion (5 min Belichtungszeit) der Überexpression erfolgte mittels Anti-HA (α-HA)-Antikörpers. Als Ladekontrolle dient eine Ponceau Rot Färbung der RuBisCO. Daten wurden durch Sina Grimm erhoben.



Abb. A14 Überleben nach Überflutung von BCA3-Überexpressionslinien und dem Wildtyp Col-0. Dargestellt ist das Überleben in Abhängigkeit der Überflutungsdauer (ÜD) in Wochen [w] unter Kurztagbedingungen. Nach 2 Wochen Erholungszeit wurde das Überleben anhand der Fähigkeit zur Bildung neuer Blätter untersucht. Fotos stammen von Malte Bartylla.

6.2 Tabellen

Tab. A1 Übersicht der verwendeten Oligonukleotide mit Sequenzinformation und Verwendungszweck. Die Konzentration für semiquantitative Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR) und Klonierungen betrug 10 μM und für quantitative Echtzeit-PCR (qRT-PCR) 0,5 μM.

Bezeichnung	Sequenz	Verwendung
NoRPL13e_qPCR_fw	TCTGTTGATCACCGTCGCAA	qRT-PCR
NoRPL13e_qPCR_rev	CAGCCTTGACTTTACGGGGT	qRT-PCR
NoCBP20_qPCR_fw	GAGAGAGGACACAGAGGATGC	qRT-PCR
NoCBP20_qPCR_rev	GCTTCTACCACGTCCCCATT	qRT-PCR
NoTIP41_qPCR_fw	CCGGTTGAGGCAAAAGCAAA	qRT-PCR
NoTIP41_qPCR_rev	AGTGAGAGAGCAGCCAAATCA	qRT-PCR
NoUPF0041_qPCR_fw	ACTGGAGTTATCTGGTCTCGC	qRT-PCR
NoUPF0041_qPCR_rev	ACGACAGGCTCAGCTTCATT	qRT-PCR
NoCYP57_qPCR_fw	GCGTATGTTGTGTTCGACCC	qRT-PCR
NoCYP57_qPCR_rev	TTCCCTGACCATTCTCGCTC	qRT-PCR
Nof_PP2A_fw	TGGTCGATGAGCCGTTGTAC	qRT-PCR
Nof_PP2A_rev	TCTTCTCCAAGCGCACGAG	qRT-PCR
Nof_ACO1_fw	CATGAAGGCGTTTTCTGGTTCA	qRT-PCR
Nof_ACO1_rev	GGTATGTTCCCTCAGCCCTCTA	qRT-PCR
Nof_ACS7_fw	GGAGAGATCATCGAACAACAACG	qRT-PCR
Nof_ACS7_rev	CCGGCAAAGTAAGGTGAGTCT	qRT-PCR
NoNCED3_qPCR_fw2	TCAATGAACAGCCCGTCCAG	qRT-PCR
NoNCED3_qPCR_rev2	GCTCGTGAAGTGGGTTAGCT	qRT-PCR
Nof_CYP707A1_fw2	AACGGTTCCACTCACAACGA	qRT-PCR
Nof_CYP707A1_rev2	ACGTCATCACACTCGCTGTT	qRT-PCR
Nof_CYP707A2_fw	ACCAACGGTCTCTCACATCG	qRT-PCR
Nof_CYP707A2_rev	CAAACGCTGACATGATCGCC	qRT-PCR
Nof_Ga20ox_fw	TCACCGTTTCATGGACCGTT	qRT-PCR
Nof_Ga20ox_rev	GAGAATCTGCCGGTGAAGCT	qRT-PCR
NoGa3ox1_qPCR_fw	GGGTCCACAATCTGATATCCGG	qRT-PCR
NoGa3ox1_qPCR_rev	CTCTGCCCAAGTGACCGATT	qRT-PCR
NoTAA1_qPCR_fw	ACGCACTATCTTCACTCGCC	qRT-PCR
NoTAA1_qPCR_rev	AAACCCCAAGCGTCTCCTTC	qRT-PCR
NoYUC8_qPCR_fw	CCAGTGGTTTATGGCGAGTCA	qRT-PCR
NoYUC8_qPCR_rev	GGCATCACTCTTTCCGCATT	qRT-PCR
NoHB1_qPCR_fw	GCTGAGCAAAACCCGAAGC	qRT-PCR
NoHB1_qPCR_rev	ACGCCGTATTTAGCATGGGT	qRT-PCR
NoADH1_qPCR_fw	ACCCGAGAGAGTATGACAAACC	qRT-PCR
NoADH1_qPCR_rev	GCACTCCACACTACGGTCAA	qRT-PCR
NoLBD41_qPCR_fw2	GTTTTGACTTTCTCGCCGCC	qRT-PCR
NoLBD41_qPCR_rev2	GCCAAACAAGCCGATCCTTC	qRT-PCR
Nof_ARL_fw	CGCAGAACAGTCCGAGGAGA	qRT-PCR
Nof_ARL_rev	AAACGGAGGAGGAGGCAATG	qRT-PCR

attB1_fw	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT	Klonierung
attB2_rev	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT	Klonierung
AtBCA3_GW_fw	AAAAAGCAGGCTTAATGTCGACAGAGTCGTACGAA	Klonierung
AtBCA3_GWrevmitStop	AGAAAGCTGGGTTTTAAGACAAGGCAAAGGCAGG	Klonierung
AtBCA3_GW_rev-Stop	AGAAAGCTGGGTTAGACAAGGCAAAGGCAGGGGT	Klonierung
RsBCA3_GW_fw	AAAAAGCAGGCTTAATGTCGACGGAGTCGTACGAA	Klonierung
RsBCA3_GWrevmitStop	AGAAAGCTGGGTTTTAAGACAAGGCAAAAGCAGG	Klonierung
RsBCA3_GW_rev-Stop	AGAAAGCTGGGTTAGACAAGGCAAAAGCAGGGGT	Klonierung
AtBCA3_fw2	TCACTTGCCAAGAGCCAGAC	RT-PCR
AtBCA3_rev2	AAGACAAAAGATTCCCCAAGGA	RT-PCR
RsBCA3_fw2	GCACTAGCCAAGAGCCAGAG	RT-PCR
RsBCA3_rev	AGTCGAGGTCCCAGAGATCA	RT-PCR
hph_fw	AGTACTTCTACACAGCCATCG	RT-PCR
hph_rev	GTTATGTTTATCGGCACTTTG	RT-PCR
Tub_ATH_fw	CTCAAGAGGTTCTCAGCAGTA	RT-PCR
Tub_ATH_rev	TCACCTTCTTCATCCGCAGTT	RT-PCR

Tab. A2 Zusammenfassung der Illuminasequenzierung von *N. officinale.* Gezeigt sind alle cDNA-Bibliotheken, deren Beschreibung, die Gesamtzahl der Reads (Reads gesamt), die Anzahl der Reads mapped und die Mappingrate (% Mapping) gegen das Referenztranskriptom von Voutsina *et al.* (2016).

Bibliothek	Beschreibung	Reads gesamt	Reads mapped	% Mapping
A I.1P	I. Replikat, Überflutung 1d, Petiole	41.958.844	35.317.866	84,17
A I.1S	I. Replikat, Überflutung 1d, Stängel	57.501.593	48.928.340	85,09
A I.2P	I. Replikat, Kontrolle 1d, Petiole	21.150.746	17.617.430	83,29
A I.2S	I. Replikat, Kontrolle 1d, Stängel	29.433.735	25.136.086	85,40
A I.3P	I. Replikat, Überflutung 2d, Petiole	39.346.813	33.377.104	84,83
A I.3S	I. Replikat, Überflutung 2d, Stängel	29.194.003	24.855.398	85,14
A I.4P	I. Replikat, Kontrolle 2d, Petiole	37.595.335	31.894.395	84,84
A I.4S	I. Replikat, Kontrolle 2d, Stängel	42.524.873	36.019.650	84,70
A II.1P	II. Replikat, Überflutung 1d, Petiole	30.567.358	26.047.217	85,21
A II.1S	II. Replikat, Überflutung 1d, Stängel	38.154.996	31.572.177	82,75
A II.2P	II. Replikat, Kontrolle 1d, Petiole	31.293.549	26.564.576	84,89
A II.2S	II. Replikat, Kontrolle 1d, Stängel	33.854.796	28.439.929	84,01
A II.3P	II. Replikat, Überflutung 2d, Petiole	32.044.747	27.111.272	84,60
A II.3S	II. Replikat, Überflutung 2d, Stängel	33.193.437	28.244.761	85,09
A II.4P	II. Replikat, Kontrolle 2d, Petiole	29.470.296	24.736.433	83,94
A II.4S	II. Replikat, Kontrolle 2d, Stängel	21.773.559	18.507.556	85,00
A III.1P	III. Replikat, Überflutung 1d, Petiole	34.361.993	28.969.298	84,31
A III.1S	III. Replikat, Überflutung 1d, Stängel	36.832.032	31.260.755	84,87
A III.2P	III. Replikat, Kontrolle 1d, Petiole	22.880.948	19.200.234	83,91
A III.2S	III. Replikat, Kontrolle 1d, Stängel	52.148.737	44.313.999	84,98
A III.3P	III. Replikat, Überflutung 2d, Petiole	23.409.515	19.946.853	85,21
A III.3S	III. Replikat, Überflutung 2d, Stängel	40.704.546	34.637.734	85,10
A III.4P	III. Replikat, Kontrolle 2d, Petiole	21.251.568	18.054.601	84,96
A III.4S	III. Replikat, Kontrolle 2d, Stängel	51.857.207	43.975.724	84,80

Tab. A3 Zusammenfassung der Illuminasequenzierung von *C. pratensis.* Gezeigt sind alle cDNA-Bibliotheken, deren Beschreibung, die Gesamtzahl der Reads (Reads gesamt), die Anzahl der Reads mapped und die Mappingrate (% Mapping) gegen das *de novo*-Transkriptomassembly.

Bibliothek	Beschreibung	Reads gesamt	Reads mapped	% Mapping
BI1	I. Replikat, Überflutung 1d	35.639.621	24.667.983	69,22
B I 2	I. Replikat, Kontrolle 1d	40.181.283	27.875.175	69,37
B I 3	I. Replikat, Überflutung 2d	41.749.996	29.399.313	70,42
B I 4	I. Replikat, Kontrolle 2d	36.970.565	25.284.089	68,39
BII 1	II. Replikat, Überflutung 1d	49.750.878	34.072.745	68,49
BII 2	II. Replikat, Kontrolle 1d	38.479.777	26.127.248	67,90
BII 3	II. Replikat, Überflutung 2d	31.810.807	22.488.264	70,69
BII 4	II. Replikat, Kontrolle 2d	58.729.892	40.428.174	68,84
B III 1	III. Replikat, Überflutung 1d	28.769.971	20.304.257	70,57
B III 2	III. Replikat, Kontrolle 1d	35.910.583	24.026.574	66,91
B III 3	III. Replikat, Überflutung 2d	43.084.825	29.937.601	69,49
B III 4	III. Replikat, Kontrolle 2d	27.148.355	17.995.875	66,29

Tab. A4 Zusammenfassung der Illuminasequenzierung von *R. palustris*. Gezeigt sind alle cDNA-Bibliotheken, deren Beschreibung, die Gesamtzahl der Reads (Reads gesamt), die Anzahl der Reads mapped und die Mappingrate (% Mapping) gegen das *de novo*-Transkriptomassembly.

Bibliothek	Beschreibung	Reads gesamt	Reads mapped	% Mapping
C 1	II. Replikat, Überflutung 1d	49.435.485	38.281.577	77,44
C II 2	II. Replikat, Kontrolle 1d	41.841.236	31.442.293	75,15
C II 3	II. Replikat, Überflutung 2d	40.936.346	31.594.943	77,18
CII4	II. Replikat, Kontrolle 2d	31.114.154	23.817.046	76,55
C III 1	III. Replikat, Überflutung 1d	41.790.232	32.919.257	78,77
C III 2	III. Replikat, Kontrolle 1d	26.516.395	19.722.116	74,38
C III 3	III. Replikat, Überflutung 2d	28.994.290	22.186.777	76,52
C III 4	III. Replikat, Kontrolle 2d	49.387.894	37.050.695	75,02
CIV1	IV. Replikat, Überflutung 1d	33.340.218	26.088.864	78,25
C IV 2	IV. Replikat, Kontrolle 1d	27.766.720	21.396.794	77,06
C IV 3	IV. Replikat, Überflutung 2d	41.646.956	31.929.357	76,67
CIV4	IV. Replikat, Kontrolle 2d	32.739.493	24.498.558	74,83

Tab. A5 Zusammenfassung der Illuminasequenzierung von *C. hirsuta***.** Gezeigt sind alle cDNA-Bibliotheken, deren Beschreibung, die Gesamtzahl der Reads (Reads gesamt), die Anzahl der Reads mapped und die Mappingrate (% Mapping) gegen das *de novo*-Transkriptomassembly.

Bibliothek	Beschreibung	Reads gesamt	Reads mapped	% Mapping
DII 1	II. Replikat, Überflutung 1d	40.842.098	34.279.557	83,93
D II 2	II. Replikat, Kontrolle 1d	39.089.345	32.953.069	84,30
D II 3	II. Replikat, Überflutung 2d	34.820.544	29.647.687	85,14
DII4	II. Replikat, Kontrolle 2d	40.203.857	34.544.741	85,92
D III 1	III. Replikat, Überflutung 1d	38.236.838	33.009.305	86,33
D III 2	III. Replikat, Kontrolle 1d	34.103.134	28.692.082	84,13
D III 3	III. Replikat, Überflutung 2d	30.655.142	25.677.117	83,76
D III 4	III. Replikat, Kontrolle 2d	41.137.518	35.353.491	85,94
D IV 1	IV. Replikat, Überflutung 1d	47.341.862	40.787.243	86,15
D IV 2	IV. Replikat, Kontrolle 1d	41.933.516	36.509.078	87,06
DIV3	IV. Replikat, Überflutung 2d	58.833.144	51.523.093	87,57
DIV4	IV. Replikat, Kontrolle 2d	26.360.805	23.099.429	87,63

Tab. A6 Zusammenfassung der Illuminasequenzierung von A. *thaliana*. Gezeigt sind alle cDNA-Bibliotheken, deren Beschreibung, die Gesamtzahl der Reads (Reads gesamt), die Anzahl der Reads mapped und die Mappingrate (% Mapping) gegen das Referenztranskriptom von araport.org.

Bibliothek	Beschreibung	Reads gesamt	Reads mapped	% Mapping
EI1	I. Replikat, Überflutung 1d	35.872.894	29.229.309	81,48
E I 2	I. Replikat, Kontrolle 1d	45.327.621	37.624.656	83,01
E I 3	I. Replikat, Überflutung 2d	30.809.191	24.095.658	78,21
E I 4	I. Replikat, Kontrolle 2d	34.248.380	27.483.070	80,25
EII1	II. Replikat, Überflutung 1d	44.728.712	35.132.928	78,55
E II 2	II. Replikat, Kontrolle 1d	26.722.692	21.560.313	80,68
E II 3	II. Replikat, Überflutung 2d	35.972.704	26.504.179	73,68
EII4	II. Replikat, Kontrolle 2d	34.443.735	29.257.171	84,94
E III 1	III. Replikat, Überflutung 1d	39.975.502	29.922.752	74,85
E III 2	III. Replikat, Kontrolle 1d	34.730.921	26.917.829	77,50
E III 3	III. Replikat, Überflutung 2d	45.394.621	34.669.035	76,37
E III 4	III. Replikat, Kontrolle 2d	56.993.990	45.583.201	79,98

Tab. A7 Zusammenfassung der Illuminasequenzierung von *R. sylvestris.* Gezeigt sind alle cDNA-Bibliotheken, deren Beschreibung, die Gesamtzahl der Reads (Reads gesamt), die Anzahl der Reads mapped und die Mappingrate (% Mapping) gegen das *de novo*-Transkriptomassembly.

Bibliothek	Beschreibung	Reads gesamt	Reads mapped	% Mapping
FI1	I. Replikat, Überflutung 1d	26.828.716	20.268.735	75,55
FI2	I. Replikat, Kontrolle 1d	41.982.227	30.439.263	72,51
FI3	I. Replikat, Überflutung 2d	26.585.688	20.170.398	75,87
FI4	I. Replikat, Kontrolle 2d	44.155.277	32.462.691	73,52
FII 1	II. Replikat, Überflutung 1d	32.093.412	24.283.351	75,66
FII 2	II. Replikat, Kontrolle 1d	44.734.855	31.981.189	71,49
FII 3	II. Replikat, Überflutung 2d	36.329.231	27.838.349	76,63
FII 4	II. Replikat, Kontrolle 2d	25.052.522	18.334.815	73,19
F III 1	III. Replikat, Überflutung 1d	37.848.362	28.920.073	76,41
F III 2	III. Replikat, Kontrolle 1d	41.403.416	30.590.511	73,88
F III 3	III. Replikat, Überflutung 2d	27.832.012	20.643.387	74,17
FIII 4	III. Replikat, Kontrolle 2d	46.269.723	33.654.637	72,74

Tab. A8 Potenzielle Referenzgene zur Normalisierung der Expressionsstärke. Referenzgene wurden auf Basis der Studie von Czechowski *et al.* (2005) ausgewählt. Dargestellt sind die Nasturtium-Transkript-IDs, deren homologe *A. thaliana*-Transkripte sowie der log₂FC in Petiolen (P) und Stängeln (S) nach 1 d und 2 d Überflutung.

Nacturtium ID		AGI Appotation		log₂FC	log₂FC	log₂FC
Nasturtium-iD	AGI	Annotation	P 1d	P 2d	S 1d	S 2d
GEMC01047872.1	AT5G44200.1	CBP20	0,4284	0,2788	-0,1612	0,3943
GEMC01047873.1	AT5G44200.2	CBP20	-0,0618	0,1640	0,0719	-0,0625
GEMC01018247.1	AT4G33060.1	CYP57	0,0074	-0,0506	-0,0634	-0,0305
GEMC01057044.1	AT1G13320.3	PP2AA3	-0,0635	0,1305	0,0958	-0,0001
GEMC01057049.1	AT1G13320.2	PP2AA3	0,3620	0,0625	0,4822	0,2635
GEMC01037492.1	AT5G23900.1	RPL13e	-0,0420	-0,7349	-0,0761	-0,5070
GEMC01031738.1	AT4G34270.1	TIP41	-0,0025	-0,2682	-0,0724	-0,2311
GEMC01018858.1	AT4G22310.1	UPF0041	0,0059	0,0731	0,1027	0,2669

Spezies	Transkript	log₂FC 1d	log ₂ FC 2d	P_{adj} 1d	P_{adj} 2d
A. thaliana	AT1G23730.1	-0,23	-0,12	8,05E-01	8,98E-01
C. hirsuta	Chr1_GG_742_c1_g1_i1	-0,21	0,06	7,73E-01	9,38E-01
C. pratensis	TRINITY_DN31325_c0_g1_i2	6,14	5,26	1,34E-01	2,18E-01
C. pratensis	TRINITY_DN31325_c0_g1_i3	9,41	8,10	7,69E-07	2,86E-05
C. pratensis	TRINITY_DN50656_c3_g1_i1	2,46	2,14	1,17E-12	1,09E-09
C. pratensis	TRINITY_DN50656_c3_g1_i3	7,35	7,91	8,00E-59	5,15E-63
R. palustris	TRINITY_DN38887_c0_g1_i3	0,05	0,28	9,22E-01	4,98E-01
R. palustris	TRINITY_DN38887_c0_g1_i7	3,31	3,97	4,71E-03	8,50E-05
R. sylvestris	TRINITY_DN41392_c0_g1_i14	7,47	8,14	1,77E-52	7,25E-59
R. sylvestris	TRINITY_DN41392_c0_g1_i16	0,99	-0,06	6,04E-01	9,86E-01
R. sylvestris	TRINITY_DN41392_c0_g1_i7	2,98	2,56	1,09E-03	5,23E-03
R. sylvestris	TRINITY_DN41392_c0_g1_i9	8,72	11,68	1,23E-28	2,44E-32

Tab. A9 Übersicht Genexpression von *BCA3* **(AT1G23730) bei Überflutung.** Gezeigt sind die (homologen) Transkripte, deren Expression als log₂FC und *P*_{adj} nach 1 d und 2 d.

6.3 Daten

Auf einer beigefügten Daten CD-ROM befinden sich folgende zusätzliche Informationen:

Daten A1 RNA-seq Genexpressionsanalyse von *N. officinale.* Die Datei enthält die Genexpressionsdaten von Petiolen und Stängeln nach 1 d und 2 d Überflutung.

Daten A2 RNA-seq Genexpressionsanalyse des Multispezies-Vergleichs. Die Datei enthält die einzelnen Genexpressionsdaten von *A. thaliana, C. hirsuta, C. pratensis, R. palustris, R. sylvestris* sowie die zusammengefügten Genexpressionsdaten aller Arten nach 1 d und 2 d Überflutung.

Daten A3 GO-Analyse der Gencluster von *N. officinale.* Die Datei enthält die GO-Kategorien der Gencluster, die durch *fuzzy K-means-Clustering* erhalten wurden (Abb. 13).

Daten A4 GO-Analyse der differenziell exprimierten Gene (DEGs) im Multispezies-Vergleich. Die Datei enthält die GO-Kategorien der induzierten und reprimierten DEGs nach 1 d und 2 d Überflutung sowie der Schnittmenge aus 1 d und 2 d Überflutung von *A. thaliana*, *C. hirsuta*, *C. pratensis*, *R. palustris* und *R. sylvestris* (Abb. 37).

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen beteiligten Personen bedanken, die mich bei der Anfertigung der Dissertation begleitet und unterstützt haben.

Besonders danken möchte ich Prof. Angelika Mustroph für die großartige Betreuung des Projekts und die enorme Unterstützung, insbesondere bei der bioinformatischen Auswertung. Vielen Dank für die Freiheit, meine eigenen Ideen verfolgen zu können sowie für die Ermöglichung der Forschungsaufenthalte in den Niederlanden und der Teilnahme an zahlreichen Konferenzen.

Ein großer Dank geht an Dr. Hans van Veen von der Universität Utrecht für das Erstellen der Referenztranskriptome und die unermüdliche Geduld beim Erklären der bioinformatischen Auswertung mit R. Danke auch für den Anreiz, meine persönlichen Grenzen zu überschreiten.

Herzlichen Dank auch an Dr. Rashmi Sasidharan von der Universität Utrecht für die wertvollen Anregungen und konstruktive Kritik und dafür, dass ich so oft nach Utrecht zurückkommen durfte.

Vielen Dank an Prof. Stephan Clemens für sein Feedback und viele interessante Denkanstöße.

Ein ganz besonderer Dank gilt Judith Bäumler, die mir schon seit Beginn des Studiums immer mit Rat und Tat zur Seite stand und mir bei unzähligen fachlichen und privaten Angelegenheiten geholfen hat. Ich bin froh, dass wir diesen abenteuerlichen Weg gemeinsam gegangen sind.

Ich danke allen Mitarbeitern des Lehrstuhls Pflanzenphysiologie der Universität Bayreuth für die gute Zusammenarbeit und viele schöne Freizeitaktivitäten. Besonders danke ich Maria Klecker und Manuel Braun für zahlreiche inspirierende Gespräche, Pia Schuster für ihre Hilfe während der Ernte der RNAseq Proben sowie Dr. Michael Weber, Dr. Hassan Ahmadi, Dr. Stephan Höreth, Dr. Natalia Hess und Simon Richter für ihre wertvollen Tipps bezüglich der Kallus- und Sprossinduktion.

Danke auch an alle Mitarbeiter des Lehrstuhls Plant Ecophysiology der Universität Utrecht für die herzliche Aufnahme ins Team, die tatkräftige Unterstützung bei der Durchführung von Experimenten sowie die zahlreichen Diskussionen während der Coffee Break, bei denen ich immer etwas Neues dazu gelernt habe. Danke auch für die Einladungen zu sämtlichen Verteidigungen, die für mich immer ein besonderes und lehrreiches Erlebnis waren.

Ich danke allen Kooperationspartnern für eine reibungslose und produktive Zusammenarbeit: Dr. Melis Akman für die Vorbereitung und Sequenzierung der Proben zur Transkriptomanalyse, Dr. Alfons Weig für die ersten Schritte der bioinformatischen Auswertung der RNA-seq Daten, Prof. Ole Pedersen für die Messung der internen Sauerstoffkonzentration sowie der Dunkelatmung, Dr. Pulu Sun und Dr. Robert Schuurink für die Messung der ABA-Konzentrationen sowie Prof. Yasushi Todoroki und Dr. Jun Takeuchi für die Bereitstellung von Abscinazole-E3M.

Vielen Dank auch an Dr. Philipp Gasch, dessen weise Ratschläge und motivierende Worte mich über die Betreuung meiner Masterarbeit hinaus stets begleitet haben.

Der University of Bayreuth Graduate School danke ich für die finanzielle Unterstützung bei der Teilnahme an den Konferenzen "European Plant Science Retreat" in Barcelona und Utrecht.

Darüber hinaus möchte ich mich herzlich bei meinen Eltern, meiner Schwester und meinen Freunden für ihre bedingungslose Unterstützung und ganz besonders für die aufmunternden Worte in stressigen Phasen bedanken.

Mein abschließender Dank gilt meinem kürzlich verstorbenen Großvater, der immer an mich geglaubt hat.

(Eidesstattliche) Versicherungen und Erklärungen

(§ 8 Satz 2 Nr. 3 PromO Fakultät)

Hiermit versichere ich eidesstattlich, dass ich die Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe (vgl. Art. 64 Abs. 1 Satz 6 BayHSchG).

(§ 8 Satz 2 Nr. 3 PromO Fakultät)

Hiermit erkläre ich, dass ich die Dissertation nicht bereits zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht habe und dass ich nicht bereits diese oder eine gleichartige Doktorprüfung endgültig nicht bestanden habe.

(§ 8 Satz 2 Nr. 4 PromO Fakultät)

Hiermit erkläre ich, dass ich Hilfe von gewerblichen Promotionsberatern bzw. –vermittlern oder ähnlichen Dienstleistern weder bisher in Anspruch genommen habe noch künftig in Anspruch nehmen werde.

(§ 8 Satz 2 Nr. 7 PromO Fakultät)

Hiermit erkläre ich mein Einverständnis, dass die elektronische Fassung der Dissertation unter Wahrung meiner Urheberrechte und des Datenschutzes einer gesonderten Überprüfung unterzogen werden kann.

(§ 8 Satz 2 Nr. 8 PromO Fakultät)

Hiermit erkläre ich mein Einverständnis, dass bei Verdacht wissenschaftlichen Fehlverhaltens Ermittlungen durch universitätsinterne Organe der wissenschaftlichen Selbstkontrolle stattfinden können.

.....

Ort, Datum, Unterschrift