



UNIVERSITÄT  
BAYREUTH



Projektverbund · Strategien zur Anpassung  
von Kulturpflanzen an den Klimawandel

Abschlussbericht Teilprojekt 3

# Toleranz gegenüber Staunässe und Überflutung bei Raps

## Projektverbund BayKlimaFit

Strategien zur Anpassung von Kulturpflanzen an den  
Klimawandel

## Finanziert durch

Bayerisches Staatsministerium für  
Umwelt und Verbraucherschutz  
Rosenkavalierplatz 2  
81925 München

## Projektnehmer

Universität Bayreuth  
Lehrstuhl Pflanzenphysiologie  
Prof. Dr. Angelika Mustroph  
Universitätsstr. 30  
95440 Bayreuth  
Tel.: (0921) 55-2629  
Fax: (0921) 55-2642  
E-Mail: [angelika.mustroph@uni-bayreuth.de](mailto:angelika.mustroph@uni-bayreuth.de)  
Web: [www.bayklimafit.de](http://www.bayklimafit.de)

## Berichtszeitraum:

1. Februar 2016 bis 31. Januar 2019



finanziert durch  
Bayerisches Staatsministerium für  
Umwelt und Verbraucherschutz



## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Kurzzusammenfassung</b> .....	<b>3</b>
<b>2</b>	<b>Einführung</b> .....	<b>4</b>
<b>3</b>	<b>Zielstellung</b> .....	<b>5</b>
<b>4</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion</b> .....	<b>6</b>
4.1	Analyse der Staunässesensitivität verschiedener Rapssorten im adulten Stadium im Gewächshaus.....	6
4.2	Analyse der Staunässesensitivität verschiedener Rapssorten in der Klimakammer .....	10
4.3	Analyse der Staunässesensitivität verschiedener Rapssorten im Hydrokultursystem .....	11
4.4	Staunässetoleranz asiatischer Rapssorten.....	13
4.5	Analyse der Genexpression in Rapspflanzen nach Hypoxie und Überflutung....	16
4.6	Projekterfolge und deren Verwertbarkeit .....	22
<b>5</b>	<b>Veröffentlichungen im Rahmen des Projekts</b> .....	<b>23</b>
<b>6</b>	<b>Vernetzungen</b> .....	<b>23</b>
<b>7</b>	<b>Bestehende und entstandene Industriebeteiligung/-en</b> .....	<b>24</b>
<b>8</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>24</b>
<b>9</b>	<b>Ausblick</b> .....	<b>25</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>26</b>
	<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>28</b>
	<b>Anhang</b> .....	<b>29</b>

## 1 Kurzzusammenfassung

Die im Zuge des Klimawandels vermehrt vorkommenden Starkregenereignisse führen zu Staunässe und Überflutungen von landwirtschaftlichen Kulturen. Die unter Wasser verminderte Verfügbarkeit von Sauerstoff und Kohlendioxid führt zu einer Energiekrise in den Pflanzenzellen, die zu Wachstumsstörungen und in der Folge zu Ernteeinbußen führt. Die meisten Kulturpflanzen, insbesondere auch Raps, sind sehr empfindlich gegenüber diesem Stress.

Im Projekt sollten Ursachen für die hohe Überflutungsempfindlichkeit von Raps untersucht werden. Daneben sollte die Bandbreite der Toleranz gegenüber Staunässe von in Bayern etablierten Varietäten ermittelt werden, um Sorten mit einem Potential für erhöhte Staunässetoleranz zu finden. Verschiedene Rapssorten wurden auf ihre Staunässesensitivität hin überprüft. Die verwendeten 18 bayerischen und 7 asiatischen Sorten zeigten jedoch keine deutlichen und reproduzierbaren Unterschiede in der Toleranz. Die molekularen Reaktionen von Raps auf Staunässe und Überflutung konnten dagegen sehr gut charakterisiert werden. Hier leistete das Projekt einen wichtigen Beitrag, da für viele Pflanzenarten die grundlegenden Stressreaktionen bisher noch nicht bekannt sind. Das Projekt hat erstmalig eine Datengrundlage geschaffen, deren Basis durch einen Vergleich mit anderen sensitiven und toleranten Arten aus der Familie der Brassicacea noch erweitert werden kann. Die Ergebnisse des Projekts bilden die Grundlage zur Identifizierung spezifischer Toleranzfaktoren, für gezielte Sortenscreens und züchterische Ansätze.

## 2 Einführung

Pflanzen als ortsständige Organismen müssen sich an die wechselnden Bedingungen in ihrer Umgebung anpassen. Dies können z. B. Schwankungen in der Temperatur, dem Lichtangebot, der Nährstoffverfügbarkeit oder der Wasserverfügbarkeit sein. Insbesondere letzteres stellt im Laufe der Wachstumsperiode die Pflanzen immer wieder vor neue Herausforderungen. Zeiten von Trockenheit wechseln sich ab mit Zeiten von Starkregen, und Pflanzen müssen entsprechend auf diesen Wechsel reagieren, um sich erfolgreich fortpflanzen zu können.

Solche Wechsel in den Wachstumsbedingungen werden zwar im Normalfall von den meisten Pflanzen überlebt, da entsprechende Anpassungsreaktionen aktiviert werden können. Dies führt jedoch in der Regel zu einem Rückgang des Wachstums und der Fortpflanzungseffektivität. Bei Kulturpflanzen kommt es deswegen häufig zu Ernteeinbußen, die den Ertrag teilweise erheblich mindern. In Zeiten des Klimawandels nehmen extreme Wetterereignisse immer weiter zu, z. B. wurden vermehrt Hochwasserereignisse an kleinen und großen Flüssen in Bayern vorhergesagt und auch schon in den letzten Jahren beobachtet. Dadurch wird es nicht nur vermehrt zu Bodenerosion und Bodenkontamination kommen, was die Qualität der Böden beeinträchtigt. Auch die Ernteeinbußen werden drastisch zunehmen.

In diesem Projekt liegt der Focus auf dem Stressor Starkregen, der zu Staunässe und Überflutungen von landwirtschaftlichen Kulturen führt. Alle mitteleuropäischen Nutzpflanzen reagieren empfindlich auf Staunässe, nur die tropischen Kulturpflanzen Reis und Taro können Staunässe sehr gut tolerieren.

Unter Staunässe sinkt die Sauerstoffverfügbarkeit insbesondere im Wurzelbereich, der auf Energieproduktion durch mitochondriale Atmung angewiesen ist. Durch die entstehende Energiekrise kommt es zu verminderter Wasser- und Nährstoffaufnahme, zu einer Wachstumsretardation und schließlich zum Absterben der Pflanzen [1], [2]. Tolerante Pflanzen können auf verschiedene Weise auf Staunässe reagieren. Zum einen können sie mit anatomischen Veränderungen antworten und z. B. ein Durchlüftungsgewebe aufbauen, um die überfluteten Pflanzenteile mit sauerstoffreicher Luft zu versorgen [3], [4]. Diese und weitere anatomische Anpassungen werden zum Teil durch das Pflanzenhormon Ethylen vermittelt [5]. Zudem scheinen auch anatomische Besonderheiten auf der Oberfläche der Blätter wichtig zu sein, z.B. die Fähigkeit zur Ausbildung eines Gasfilms [6].

Daneben sind Anpassungen des Stoffwechsels zu beobachten, z. B. die Induktion von Gärungsenzymen, die Induktion energiesparender Stoffwechselwege sowie die Verminderung von energieverbrauchenden Biosyntheseprozessen [1], [2]. Solche Modifikationen werden zum großen Teil über einen kürzlich identifizierten Mechanismus reguliert, der auf der sauerstoffabhängigen Instabilität von ERF-Transkriptionsfaktoren der Gruppe VII beruht, die die Genexpression unter Sauerstoffmangel regulieren [7], [8], [9], [10], [11].

Raps als bedeutende Ölpflanze wird wieder vermehrt in Bayern angebaut (Zahlen laut Bericht der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft 2018). Nach einem Tiefpunkt in der Anbaufläche von Raps im Jahr 2015 (104.300 ha) stieg sie in den letzten Jahren wieder an, erreichte jedoch nicht die Rekordwerte von 2007 (172.797 ha). Aufgrund der starken Tro-

ckenheit im Frühjahr und Sommer 2018 blieb der Ertrag deutlich hinter denen der letzten Jahre zurück (32,6 dt/ha im Vergleich zu 38 - 45 dt/ha). Raps dient insbesondere in nördlichen Teilen Frankens als wichtiges Fruchtfolgeglied im Getreideanbau, hier gab es 2018 besonders große Ernteaufälle aufgrund der Trockenheit.

Raps ist besonders empfindlich gegenüber Staunässe und Überflutung. Anatomische Modifikationen konnten bisher gar nicht beobachtet werden [12], es wurden jedoch hierfür nur wenige Sorten analysiert. Die molekularen Antworten auf Sauerstoffmangel sind bisher größtenteils unbekannt, es existieren nur wenige Untersuchungen asiatischer Sorten [13], [14], [15]. Während der Projektlaufzeit sind nur sehr wenige Publikationen anderer Autoren dazugekommen, insbesondere eine neuere Arbeit zu zwei asiatischen Sorten [16]. Im Projektbericht wird auf diese Arbeiten Bezug genommen. Dies unterstreicht die Bedeutung unseres Projekts in Bezug auf das Legen von Grundlagen, um langfristig die Anpassungsfähigkeit von Raps gegenüber klimawandelbedingter Zunahme von Staunässe und Überflutung zu erhöhen.

### 3 Zielstellung

Das Ziel dieses Projekts war es, die molekulare Antwort von Raps auf Staunässe besser zu verstehen und Ansätze zu entwickeln, wie die Staunässetoleranz dieser wichtigen Kulturpflanze verbessert werden könnte.

**Teilphase 1** des Projekts beinhaltete die Analyse verschiedener Rapsorten mit unterschiedlichen Methoden der Anzucht und Stressbehandlung, um mögliche Unterschiede in der Toleranz zwischen den Sorten ermitteln zu können. Neben 18 bayerischen Sorten wurden auch 7 asiatische Sorten mit einbezogen, von denen Staunässetoleranz bereits beschrieben worden war.

**Teilphase 2** des Projekts beinhaltete die Analyse der molekularen Reaktionen von Raps auf Staunässe und Überflutung mit Hilfe der RNA-Sequenzierung und bioinformatischer Analysen. Diese Phase hatte zwei Ziele: **Teilphase 2a** sollte generelle molekulare Reaktionen von Raps auf Staunässe und Überflutung analysieren und mit denen anderer sensibler und toleranter Brassicaceae vergleichen. So sollte die molekulare Ursache der Staunässesensitivität von Raps erforscht werden. **Teilphase 2b** sollte Unterschiede in der Staunässesensitivität verschiedener Rapsorten mit Unterschieden in der molekularen Antwort in Zusammenhang bringen. Mit diesen Informationen könnten in der Zukunft Marker definiert werden, die in der Züchtung von staunässetoleranteren Rapsorten eingesetzt werden könnten. Mit Hilfe solcher Sorten wäre ein Anbau von Raps auch auf überflutungsgefährdeten Böden möglich. Eine damit verbundene frühe Bodenbedeckung würde zudem die Bodenerosion deutlich vermindern. Gleichzeitig könnten durch stabilere Erträge Ernteverluste und somit Verluste an Ressourcen verringert werden.

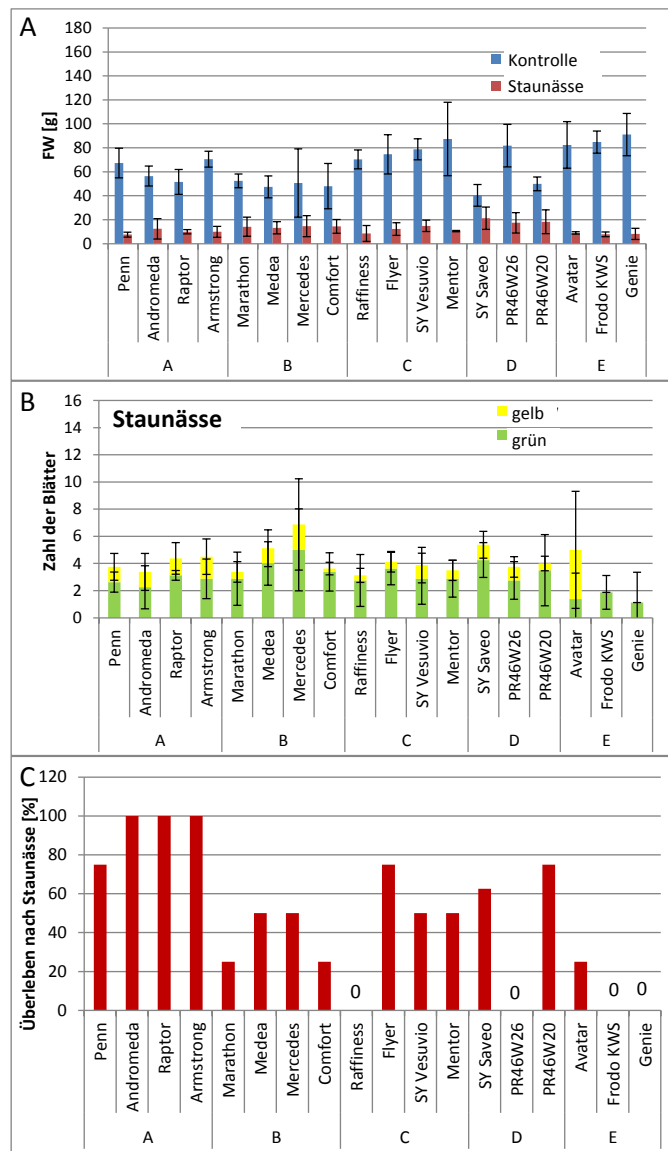
## 4 Ergebnisse und Diskussion

### 4.1 Analyse der Staunässesensitivität verschiedener Rapssorten im adulten Stadium im Gewächshaus

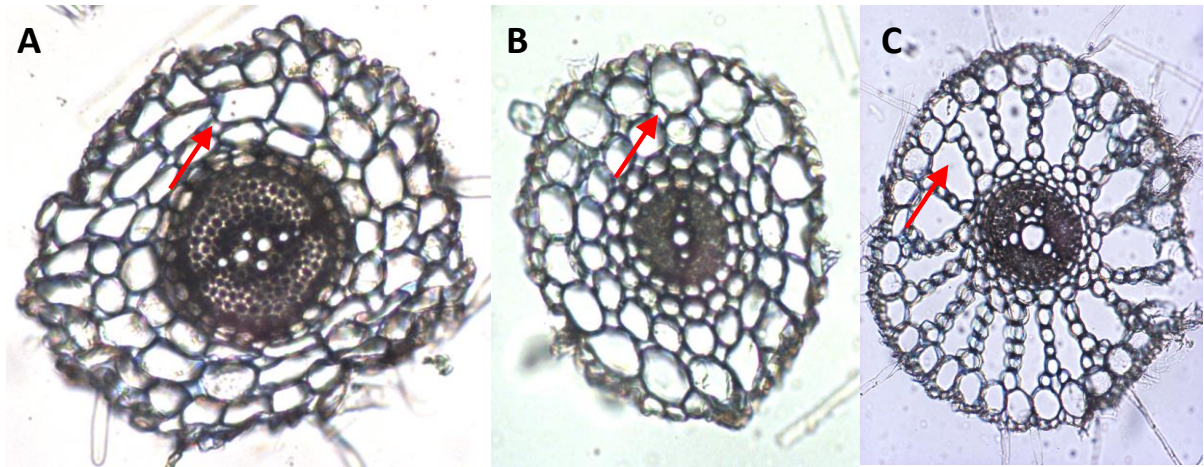
Das erste Ziel dieses Projekts war es, Rapssorten auf Staunässesensitivität hin zu überprüfen. Von der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft (Alois Aigner) wurden 18 Rapssorten bezogen, die aktuell in Bayern angebaut werden. Diese wurden zunächst im Gewächshaus angezogen, um ältere Pflanzen beobachten zu können. Es sollten verschiedene Parameter ermittelt werden, zum einen das Frisch- und Trockengewicht nach Staunässe, die Überlebensrate sowie anatomische (Durchlüftungsgewebe in der Wurzel) und biochemische (Aktivität der Alkohol-Dehydrogenase [ADH]) Marker für Anpassungsreaktionen.

Im ersten Satz an Experimenten wurden jeweils gleichzeitig vier Rapssorten für 40-48 Tage angezogen. Die Pflanzen wurden für 2, 3 und 4 Wochen mit Staunässe behandelt und dann geerntet bzw. während einer Wiederbelüftungsperiode beobachtet. Im Gegensatz zu einem Vorversuch in der Klimakammer zeigten die Rapspflanzen, ähnlich wie im Feld, bereits nach zwei Wochen starke Schäden durch Staunässe, sowie eine starke Wachstumshemmung und ein Vergilben der Blätter (Abbildung 1). Bei der Ernte der Pflanzen fiel auf, dass große Teile des Wurzelbereichs bereits abgestorben waren, so dass die Analyse der Wurzelanatomie nahezu unmöglich war. Die wenigen Querschnitte zeigten ein völliges Fehlen von Durchlüftungsgewebe (Abbildung 2), wie bereits früher beschrieben [12]. Die Analyse der ADH-Aktivitäten war durch technische Probleme nicht für alle Sorten möglich, die Daten schwankten sehr stark (nicht gezeigt). Die Daten zum Frisch- und Trockengewicht zeigten deutliche Unterschiede zwischen Behandlung und Kontrolle, jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den Sorten (Abbildung 1A). Die Überlebensrate variierte recht stark zwischen den untersuchten Sorten und den unterschiedlichen Experimenten (Abbildung 1C).

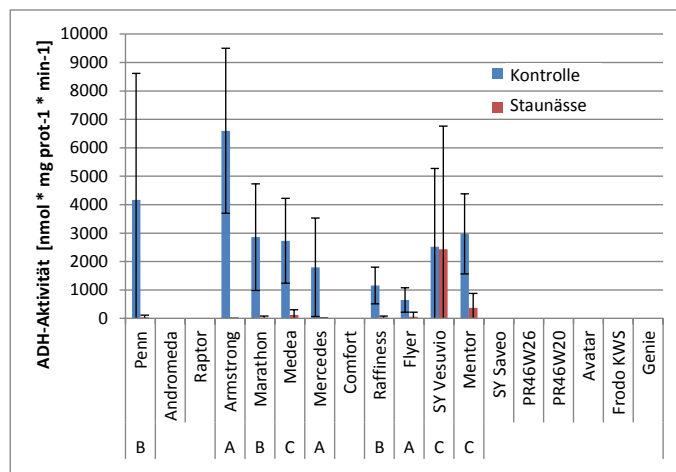
In einem zweiten Satz an identischen Experimenten mit einer anderen Artenzusammenstellung sollten die ersten Ergebnisse bestätigt werden sowie die Probleme bei der Messung der ADH-Aktivität beseitigt werden. Letzteres Ziel gelang, erfolgreich wurde die ADH-Aktivität von allen Pflanzen gemessen, einmal unter Kontrollbedingungen und einmal nach Stressbehandlung. Die ADH-Aktivität von gestressten Pflanzen nach 2 Wochen Staunässe war nahezu null, in Übereinstimmung mit dem beobachteten Absterben der Wurzeln, während die Kontrollpflanzen teilweise sehr hohe ADH-Aktivitäten aufwiesen (Abbildung 3). Möglicherweise reagieren die sehr empfindlichen Rapspflanzen bereits bei moderater Bodenfeuchte mit einer Erhöhung der ADH-Enzymaktivität. Hierzu sind weitere Untersuchungen erforderlich. Die Frischgewichte und Überlebensraten zeigten in diesem Wiederholungsexperiment erneut große Unterschiede zwischen den Rapssorten, jedoch mit anderen Tendenzen als beim ersten Satz von Experimenten (Abbildung 4). Vermutlich ein Grund hierfür waren die nicht komplett vermeidbaren Schwankungen in den Aufzuchtbedingungen im Gewächshaus (Temperatur, Luftfeuchtigkeit, Lichtangebot, Pathogenbefall).



**Abbildung 1:** Wachstums- und Überlebensdaten des ersten Screenings von 18 Rapsorten im Gewächshaus. **A:** Frischgewicht des Sprosses nach 2 Wochen Staubnässe sowie unter Kontrollbedingungen (n = 4 je Genotyp). **B:** Zahl der grünen und gelben Blätter nach 2 Wochen Staubnässe (n = 8 je Genotyp). **C:** Überlebensrate in % nach 2 Wochen Staubnässe und 4 Wochen Wiederbelüftung (n = 4 je Genotyp). Die Buchstaben A - E stehen für die einzelnen Teilversuche.

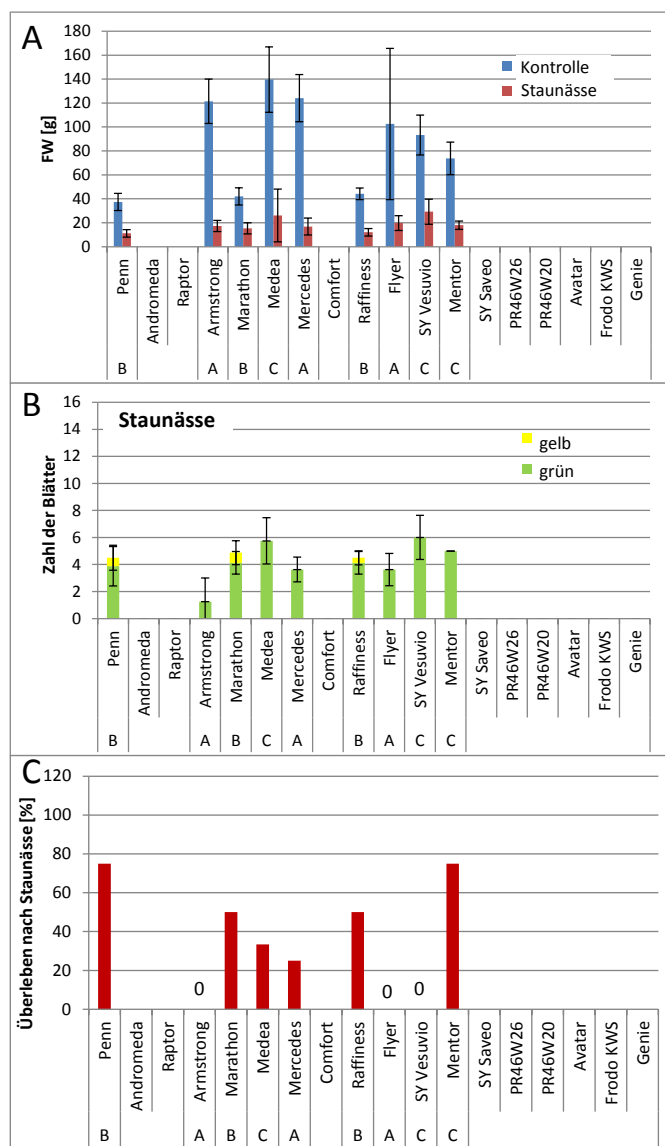


**Abbildung 2:** Wurzel-Querschnitte der Rapsorte Frodo unter normalen Wachstumsbedingungen (**A**) sowie nach 8 Wochen Staunässe (**B**). **C:** Wurzel-Querschnitt einer staunässe-toleranten Brassicaceae (*Nasturtium officinale*) zum Vergleich. Jeweils ein luftgefüllter Hohlraum ist mit einem roten Pfeil markiert.



**Abbildung 3:** ADH-Aktivitäten in Rapswurzeln unter Kontrollbedingungen und nach 2 Wochen Staunässe. Daten wurden erhoben aus dem zweiten Satz an Screening-Experimenten (siehe auch Abbildung 4). Das Experiment wurde nur mit 9 der 18 Rapsorten durchgeführt. Die Buchstaben A - C stehen für die einzelnen Teilversuche.

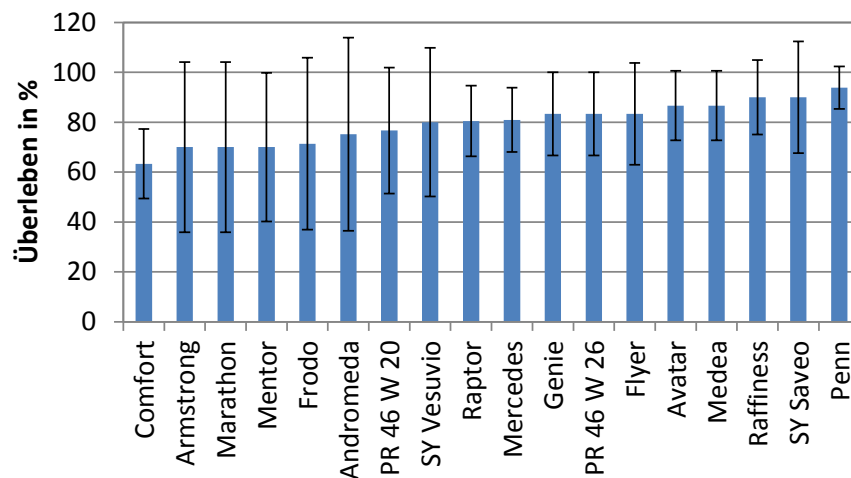




**Abbildung 4:** Wachstums- und Überlebensdaten des zweiten Screenings einer Auswahl der 18 Rapssorten im Gewächshaus. **A:** Frischgewicht des Sprosses nach 2 Wochen Staunässe sowie unter Kontrollbedingungen (n = 4 je Genotyp). **B:** Zahl der grünen und gelben Blätter nach 2 Wochen Staunässe (n = 4 - 8 je Genotyp). **C:** Überlebensrate in % nach 2 Wochen Staunässe und 4 Wochen Wiederbelüftung (n = 4 je Genotyp). Die Buchstaben A - C stehen für die einzelnen Teilversuche.

Aus diesem Grund wurden weitere experimentelle Ansätze getestet. Zum einen wurde ein reines Überlebensexperiment im Gewächshaus mit nur einem Zeitpunkt, dafür mit allen 18 Sorten gleichzeitig, angesetzt. So sollten Schwankungen in den Gewächshausbedingungen ausgeglichen werden. Dieses Experiment wurde wieder mit 6 Wochen alten Pflanzen durchgeführt, in insgesamt 5 Wiederholungen. Hierbei konnten nach 2 Wochen Überflutung keine signifikanten Unterschiede im Überleben zwischen den Sorten festgestellt werden, die Sorte Comfort war jedoch tendenziell am stärksten beeinträchtigt, die Sorte Penn zeigte am seltensten Schäden (Abbildung 5). In diesem Experiment wurden keine Proben für die Messung

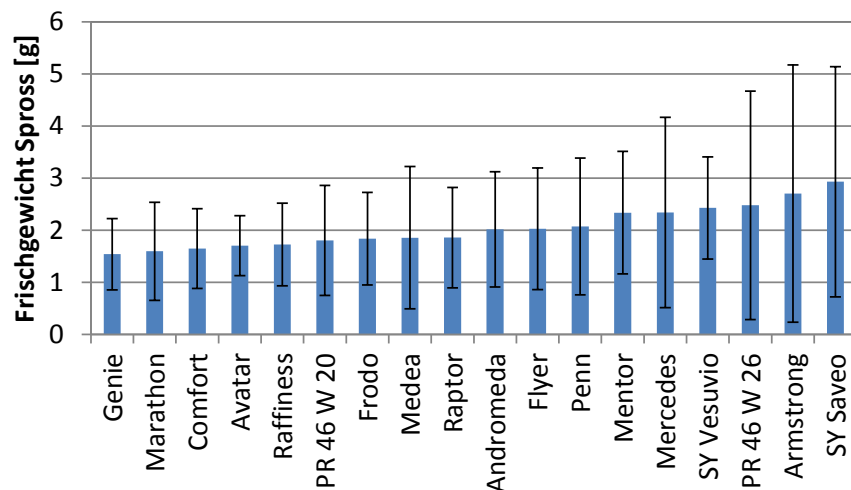
der ADH-Aktivitäten genommen. Zum anderen wurden Experimente in der Klimakammer durchgeführt (siehe unten).



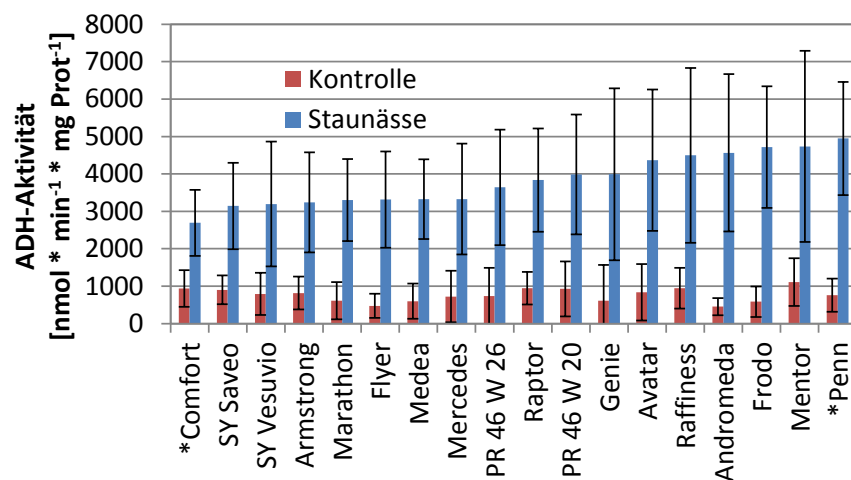
**Abbildung 5:** Überlebensraten von 8 Wochen alten Rapspflanzen im Gewächshaus nach 2 Wochen Staunässe und anschließender Wiederbelüftung. Das Experiment wurde fünfmal wiederholt, der Mittelwert +/- Standardabweichung ist gezeigt. Es traten keine signifikanten Unterschiede auf (ANOVA + Tukey HSD,  $P < 0,05$ ).

## 4.2 Analyse der Staunässesensitivität verschiedener Rapsorten in der Klimakammer

Eine weitere Versuchsreihe wurde unter kontrollierten Bedingungen in der Klimakammer durchgeführt. Hier wurde mit 2 Wochen alten Pflanzen gearbeitet. Insgesamt wurden pro Sorte je 4 Individuen in 3 - 4 Durchgängen getestet. Es wurden Frisch- und Trockengewichte sowie ADH-Aktivitäten in Wurzeln nach zwei Wochen Staunässe bestimmt. Beim Frischgewicht zeigten sich wieder keine signifikanten Unterschiede, jedoch bewegte sich die Sorte Comfort erneut im unteren Bereich der Skala (Abbildung 6). Interessanterweise zeigte diese Sorte auch die geringste ADH-Aktivität in den Wurzeln, die sich signifikant von der Sorte Penn mit der höchsten Enzymaktivität unterschied (Abbildung 7).



**Abbildung 6:** Frischgewicht der oberirdischen Pflanzenteile von 4 Wochen alten Rapspflanzen in der Klimakammer nach 2 Wochen Staunässe. Jede Sorte wurde mindestens dreimal mit je 4 Individuen getestet, der Mittelwert +/- Standardabweichung ist gezeigt. Es traten keine signifikanten Unterschiede auf (ANOVA + Tukey HSD,  $P < 0,05$ ).



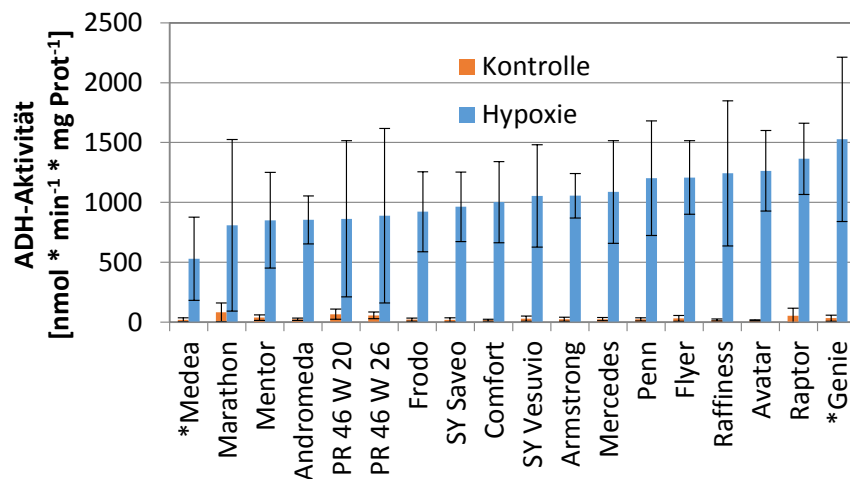
**Abbildung 7:** ADH-Aktivität in Wurzeln von 4 Wochen alten Rapspflanzen in der Klimakammer nach 2 Wochen Staunässe. Jede Sorte wurde mindestens dreimal angezogen, und jeweils mehrere Proben wurden vermessen. Der Mittelwert +/- Standardabweichung ist gezeigt. Sternchen markieren signifikant unterschiedliche Sorten (ANOVA + Tukey HSD,  $P < 0,05$ ).

### 4.3 Analyse der Staunässesensitivität verschiedener Rapsorten im Hydrokultursystem

Das Anzuchtssystem auf Erde erwies sich bei unseren weiteren biochemischen und vor allem molekularbiologischen Untersuchungen als problematisch. Zum einen führte die an den Wurzeln anhaftende Erde zu Schwierigkeiten bei der Aufreinigung der Wurzelproben für die

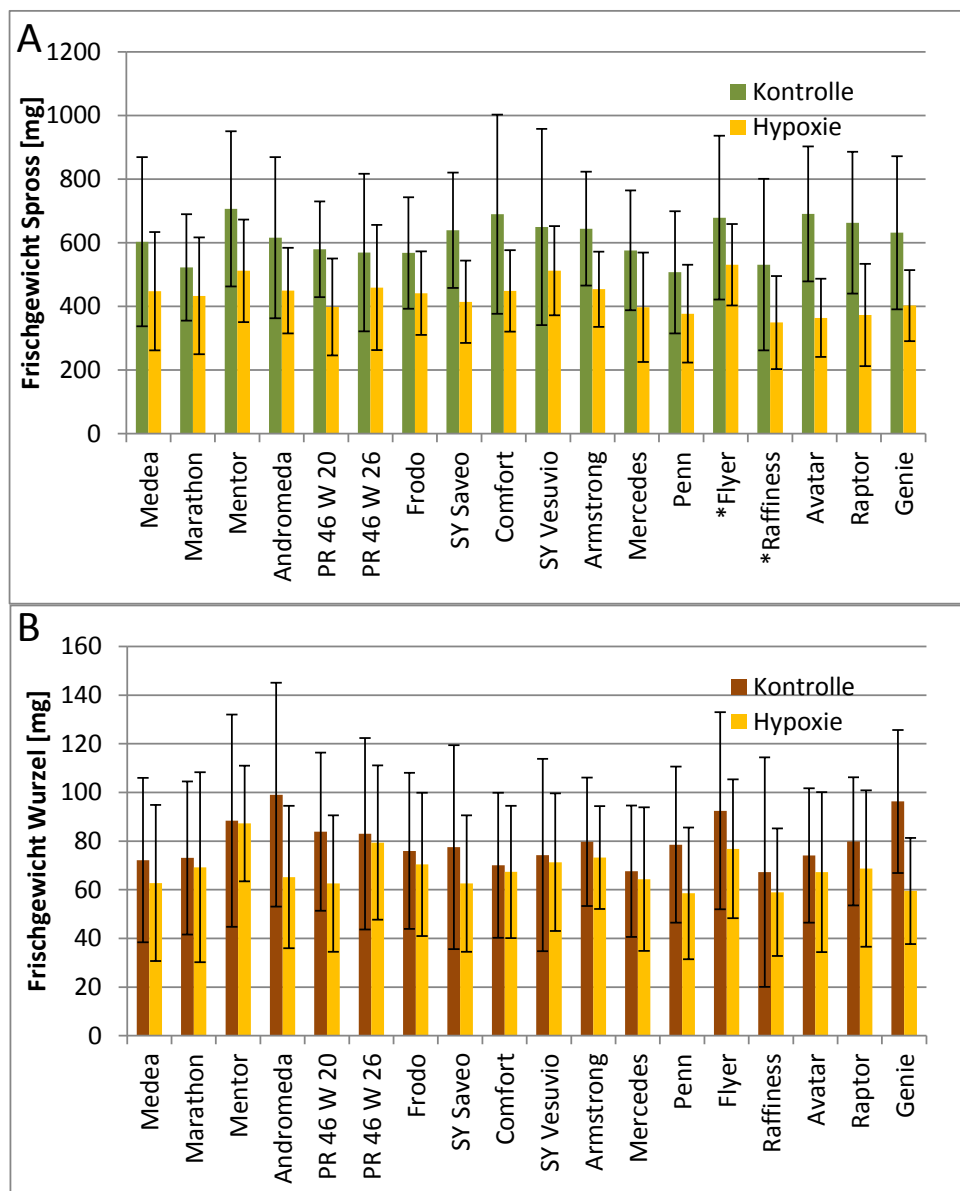
nachfolgenden Analysen. Zum anderen erwies sich insbesondere die Belüftung des Erdsystems als schwer kontrollierbar, denn ein nur geringfügig zu feuchter Boden führte in der empfindlichen Rapswurzel bereits zu einer Hypoxie, sichtbar durch hohe ADH-Aktivitäten in den Kontrollen (Abbildung 3, Abbildung 7). Daher etablierten wir ein Hydrokultursystem, in dem der Wurzelraum kontinuierlich belüftet (Kontrolle) bzw. durch Stickstoffbegasung Hypoxie (Sauerstoffmangel  $\hat{=}$  Staunässe) induziert wird, analog zu früheren Publikationen (z. B. [17]).

Dieses System resultierte in sehr niedrigen ADH-Aktivitäten der belüfteten Kontrollen, im Gegensatz zu den in Erdkultur gehaltenen Pflanzen im Gewächshaus (Abbildung 3). Hypoxie führt zu einer starken Steigerung der ADH-Aktivitäten bereits nach 24 Stunden Hypoxie (Abbildung 8). Die Sorte Medea fiel durch sehr gering aktivierte ADH-Aktivität auf, die Sorte Genie zeigte die am stärksten aktive ADH. Diese Sortenunterschiede deckten sich jedoch nicht mit den Ergebnissen aus den Experimenten auf Erdkultur (Abbildung 7).



**Abbildung 8:** ADH-Aktivität in Wurzeln von 11 Tage alten Rapspflanzen in Hydrokultur in der Klimakammer nach 24 h Hypoxie. Jede Sorte wurde mindestens dreimal angezogen, mit 4 Proben pro Anzucht. Der Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung ist gezeigt. Sternchen markieren sich signifikant unterscheidende Sorten unter Stressbedingungen, alle anderen Werte sind nicht signifikant unterschiedlich (ANOVA + Tukey HSD,  $P < 0,05$ ).

Anschließend wurden die Sorten in diesem System auf das Wachstumsverhalten unter Stressbedingungen getestet, indem sie 5 Tage der Hypoxie ausgesetzt und danach das Frisch- und Trockengewicht bestimmt wurden. So sollten auch in diesem System sensitivere und tolerantere Sorten identifiziert werden. Selbst unter diesen konstanten Bedingungen gab es kaum Unterschiede zwischen den Sorten (Abbildung 9). Hypoxie führte zu einem verringerten Wachstum, aber sehr ähnlich in allen beobachteten Sorten. Unterschiede in der ADH-Aktivität (Abbildung 8) fanden sich nicht in einem unterschiedlichen Wachstum wieder. Ergebnisse der Staunässesensitivität aus den Erdexperimenten konnten nicht bestätigt werden, z.B. befand sich die auf Erde eher empfindliche Sorte Comfort im Mittelfeld.



**Abbildung 9:** Wachstumsparemeter (Frischgewicht des Sprosses (A) und der Wurzel (B)) von 15 Tage-alten Rapspflanzen in Hydrokultur in der Klimakammer unter belüfteten Kontrollbedingungen oder nach einer 5-tägigen Behandlung mit Hypoxie im Wurzelraum (d. h. 10 Tage Belüftung + 5 Tage Hypoxie). Jede Sorte wurde mindestens dreimal angezucht, mit 5 - 10 Pflanzen pro Anzucht. Der Mittelwert +/- Standardabweichung ist gezeigt. Sternchen markieren sich signifikant unterscheidende Sorten unter Stressbedingungen, alle anderen Werte sind nicht signifikant unterschiedlich.

#### 4.4 Staunässetoleranz asiatischer Rapsorten

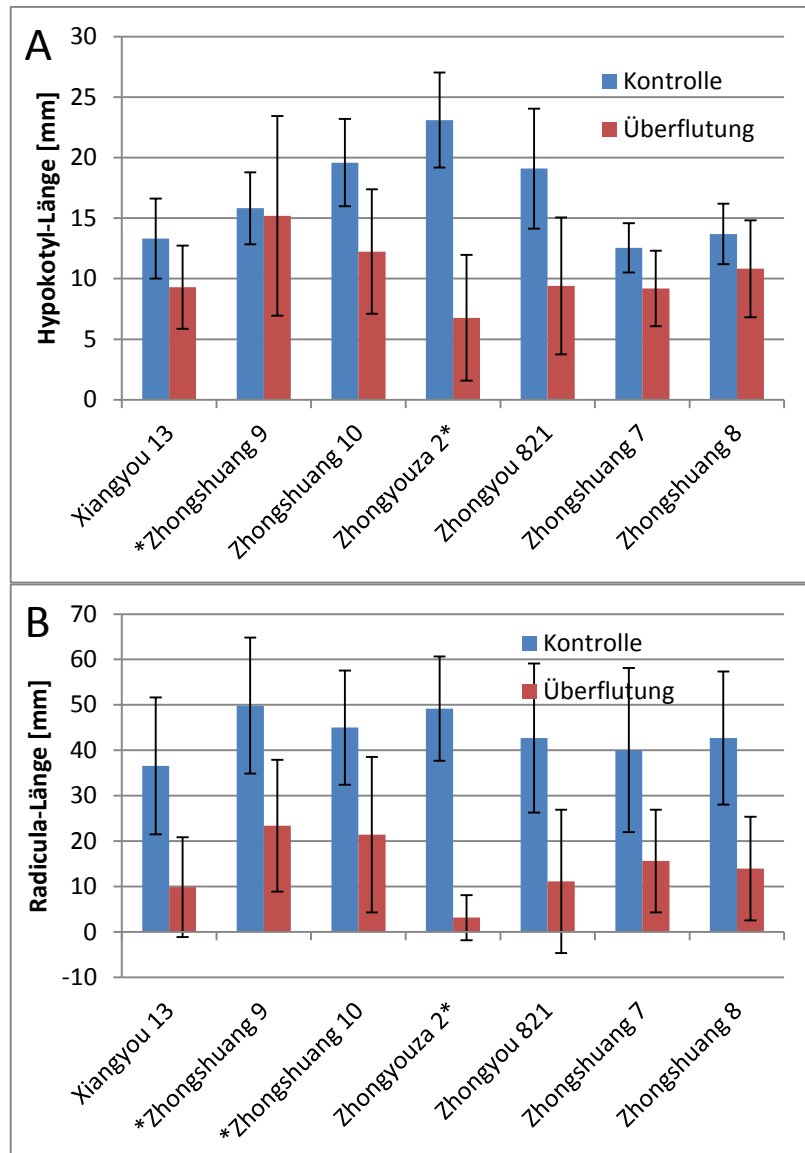
Im Rahmen des Projekts nahmen wir Kontakt auf mit den wenigen asiatischen Gruppen, die sich mit Raps unter Staunässe beschäftigen. In Asien wird Raps oft als Zwischenfrucht auf Reisfeldern angebaut und ist dort häufig Staunässe ausgesetzt. Es wurden bereits tolerante

und sensitivere Sorten beschrieben (z.B. [18], [19]), die wir in unseren Screen mit einbeziehen wollten. Wir erhielten Samen von 8 asiatischen Sorten, die wir anschließend vermehrten, darunter die als staunässetolerant beschriebenen Sorten Zhongshuang 9, Zhongshuang 10 und Xiangyou 13 sowie die als sensitiv beschriebenen Sorten Zhongshuang 8 und GH01 [18], [19], [13], [14] (Tabelle 3). Mit 7 Sorten wurden die weiteren Versuche durchgeführt.

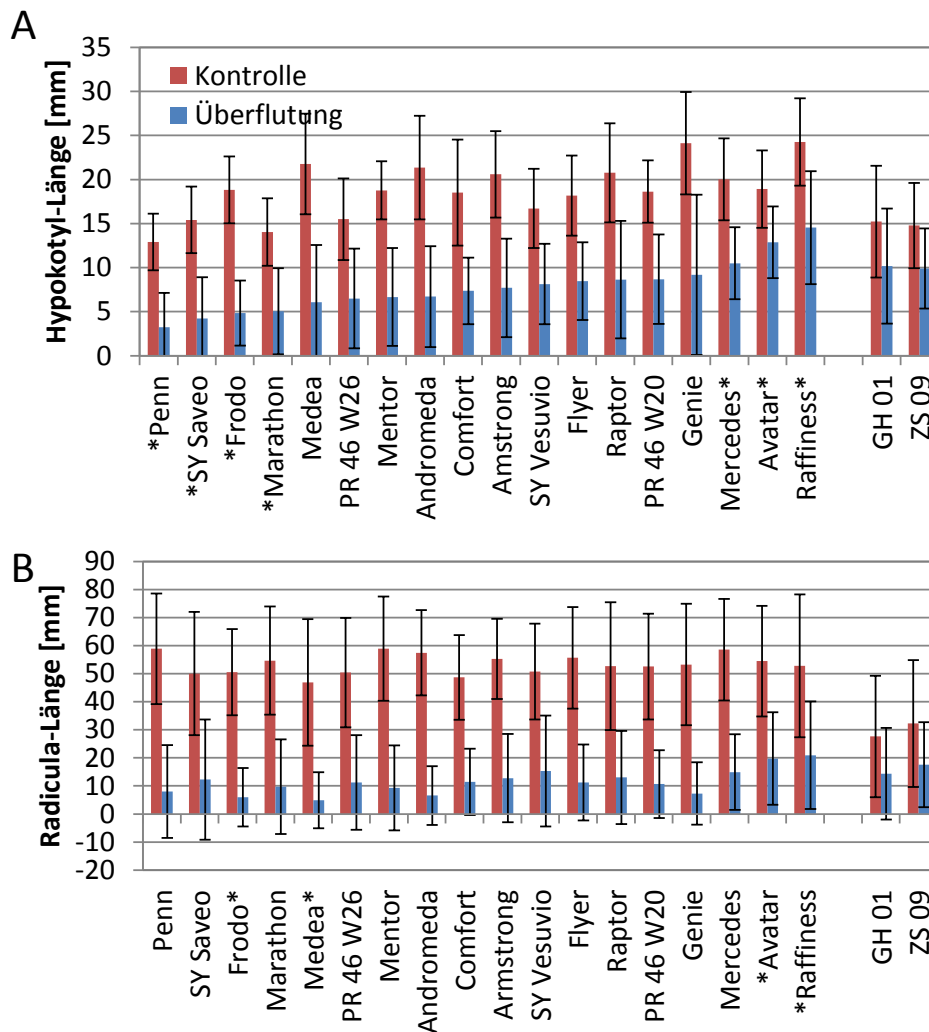
Diese Sorten waren ursprünglich in einem Keimlingscreening untersucht worden [18], [20], das wir deshalb in unseren Experimenten ebenfalls verwendeten und nach Vorexperimenten an unsere Bedingungen anpassten. Damit konnten wir zum einen die chinesischen Experimente überprüfen, zum anderen testeten wir parallel auch unsere bayerischen Sorten. 24 Stunden alte Keimlinge wurden einer Staunässe für 18 Stunden ausgesetzt und anschließend für 4 Tage unter belüfteten Wachstumsbedingungen kultiviert. Anschließend wurden Frisch- und Trockengewichte bestimmt, sowie Wurzel- und Hypokotyllängen.

In einem ersten Screen für die asiatischen Sorten konnten einige Unterschiede zwischen den Sorten festgestellt werden (Abbildung 10). Allerdings deckten diese sich nur bedingt mit den bereits publizierten Daten [18], [20]. So waren zwar die als tolerant beschriebenen Sorten Zhongshuang 9, Zhongshuang 10 auch bei uns am tolerantesten, die Sorte Xiangyou 13 erwies sich jedoch nicht als tolerant. Auch die in der Literatur beschriebenen Unterschiede zwischen den Sorten Zhongshuang 9 und GH01 konnten nicht bestätigt werden (Abbildung 11, [13], [14], [16]). Das Einbeziehen der 18 bayerischen Sorten in dieses Testsystem ergab zwar signifikante Unterschiede zwischen den Sorten (Abbildung 11), jedoch tauchten erneut andere Sorten auf als in den vorherigen Screeningsystemen.

Die Ergebnisse, aus allen verwendeten Screeningsystemen zusammengefasst, lassen darauf schließen, dass keine Sorte eindeutig als sensitiv oder tolerant zu bewerten ist. Möglicherweise sind zu geringe genetische Unterschiede eine Ursache dafür, dass keine deutlichen Unterschiede in der Staunässesensitivität zwischen den getesteten Sorten nachgewiesen werden konnten. Selbst bei gemeinsamer Betrachtung der asiatischen und bayerischen Sorten fielen keine generellen Unterschiede ins Auge (Abbildung 10 vs. Abbildung 11), auch wenn adulte Pflanzen im Gewächshaus sehr unterschiedlich wuchsen. Untersuchungen mit einer größtmöglich variablen Kollektion mit hoher genetischer Variabilität, wie z.B. durch Uwe Scholz (IPK Gatersleben), KWS Saat AG (Einbeck) und NPZ Innovation GmbH (Holtsee) zusammengestellt [21], könnten hier für mehr Klarheit sorgen. Im Rahmen dieses Projekts war die Untersuchung dieser Sortenkollektion nicht mehr möglich



**Abbildung 10:** Hypokotyl- und Radicula-Längen von Rapskeimlingen, die 24 h vorgekeimt wurden, dann 18 h mit Staunässe behandelt wurden und anschließend 4 Tage normal wachsen konnten. Jede Sorte wurde dreimal getestet, mit je etwa 10 - 12 Individuen. Der Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung aller Individuen ist gezeigt. Sorten mit Sternchen vorne unterschieden sich signifikant von Sorten mit Sternchen hinten (ANOVA + Tukey HSD,  $P < 0,05$ ).



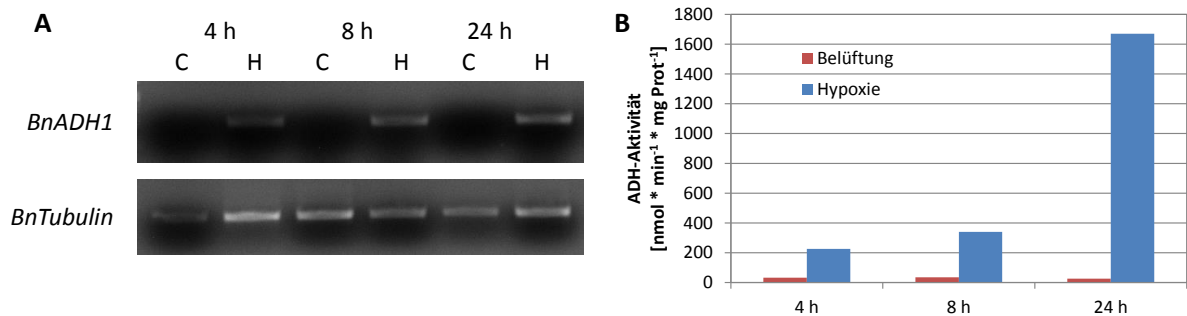
**Abbildung 11:** Hypokotyl- und Radicula-Längen von Rapskeimlingen, die 24 h vorgekeimt wurden, dann 18 h mit Staunässe behandelt wurden und anschließend 4 Tage normal wachsen konnten. Jede Sorte wurde dreimal getestet, mit je etwa 20 Individuen. Der Mittelwert +/- Standardabweichung aller Individuen ist gezeigt. Sorten mit Sternchen vorne unterschieden sich signifikant von Sorten mit Sternchen hinten (ANOVA + Tukey HSD,  $P < 0,05$ ).

#### 4.5 Analyse der Genexpression in Rapspflanzen nach Hypoxie und Überflutung

Neben den Sortenvergleichen war das zweite Ziel dieses Projekts, die transkriptionelle Antwort von Raps auf Staunässe zu untersuchen und mit Daten anderer Brassicaceae (*Arabidopsis thaliana* als Modellorganismus, *Rorippa* und *Nasturtium* als überflutungstolerante Gattungen) zu vergleichen. Neben dem grundlegenden molekularen Mechanismus für die Staunässesensitivität von Raps sollten phänotypische Unterschiede in der Staunässesensitivität verschiedener Rapsorten auf molekularer Ebene untersucht werden.



Das im Rahmen dieses Projekts etablierte Hydrokultursystem wurde verwendet, um RNA aus Wurzeln zu extrahieren und Expressionsanalysen durchzuführen. Die geernteten Wurzeln eignen sich sehr gut für biochemische und molekularbiologische Experimente, da sie frei von Bodenpartikeln und Fremdorganismen sind. Um das RNAseq-Experiment vorzubereiten, wurden Zeitreihenexperimente durchgeführt. Es sollten dabei optimale Zeitpunkte gefunden werden, um die transkriptionelle Genregulation unter Sauerstoffmangel zu untersuchen. Eine Zeitreihe mit 4, 8 und 24 h ergab zu allen Zeitpunkten eine Steigerung des ADH-Transkripts, begleitet von einer Steigerung der ADH-Aktivität (Abbildung 12).



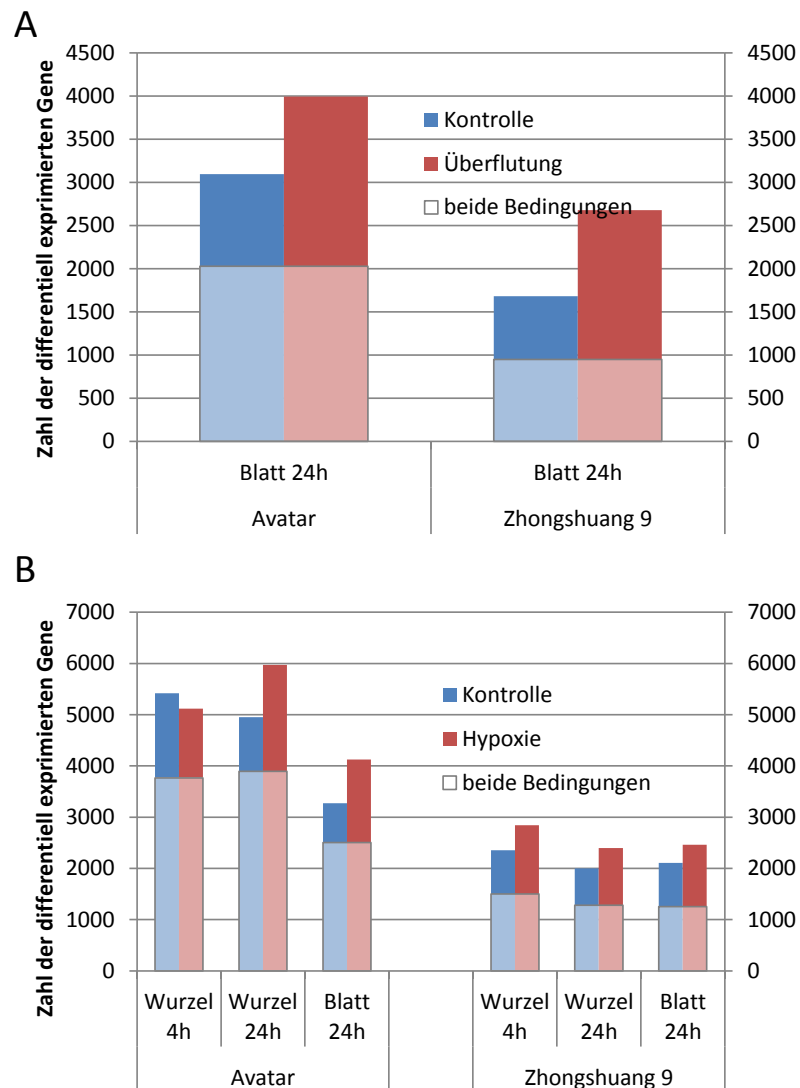
**Abbildung 12:** (A) Expression von *BnADH1* im Vergleich zu *BnTubulin* in Wurzeln von 11 Tage alten Rapspflanzen der Sorte Frodo in Hydrokultur nach 4, 8 und 24 h Hypoxie. (B) ADH-Aktivitäten der Wurzeln aus (A).

Für die Expressionsanalysen wurde die europäische Rapssorte Avatar ausgewählt, die in den durchgeführten Sortenscreens vertreten war. Sie zeigte in den Versuchen mit Keimlingen eine leicht höhere Toleranz gegenüber Staunässe (Abbildung 11), in den Experimenten mit älteren Pflanzen befand sie sich im Mittelfeld. Diese Sorte wurde auch von einer anderen Arbeitsgruppe verwendet [22], erschien also geeignet für die geplanten Experimente. Zusätzlich wurde die als tolerant beschriebene asiatische Sorte Zhongshuang 9 [16], [18], [20] verwendet, von der bereits einige Expressionsdaten existierten [13], [14]. So sollte sichergestellt werden, mit dem vorhandenen Material eine größtmögliche Variabilität der Expressionsdaten zu erhalten.

Für das RNAseq-Experiment wurden zum einen 15 Tage alte Pflanzen im Hydrokultursystem für 4 und 24 h mit Hypoxie im Wurzelbereich behandelt, und anschließend Wurzeln und Blätter zur Analyse geerntet. Die Zeitpunkte wurden anhand der Vorexperimente ausgewählt (Abbildung 12). Zum anderen wurden 15 Tage alte Rapspflanzen auf Erde überflutet und nach 24 h die Blätter geerntet. Dies erfolgte analog zu Experimenten an anderen Brassicaceae, deren Daten in unserem Labor in den letzten Jahren erhoben worden waren.

Nach der bisherigen Datenauswertung unterscheiden sich beide Genotypen so stark voneinander, dass von der Sorte Avatar ca. 76 – 80 % der Reads dem Referenzgenom [23] zugeordnet werden konnten (d.h. „mappen“), von der Sorte Zhongshuang 9 jedoch nur 70 – 75 % (Tabelle 4). Dies spiegelt sich auch in der Anzahl differentiell exprimierter Gene im Vergleich der Genotypen wider. So exprimiert die Sorte Avatar deutlich mehr Gene signifikant höher als Zhongshuang 9, während letztere Sorte weniger Gene höher exprimiert als Avatar (Abbildung 13). Fasst man alle Proben zusammen, so ergeben sich 1070 Gene mit höherer

Expression in Avatar und 399 Gene mit höherer Expression in Zhongshuang 9 (Tabelle 1). Dies weist auf große Variabilität in den beiden Sorten hin. In einem nächsten Schritt muss die Funktion dieser differentiell exprimierten Gene noch näher analysiert werden. Das kürzlich publizierte Genom der asiatischen Sorte Zhongshuang 11, die als moderat staunässetolerant beschrieben wurde [24], steht nun zusätzlich als Mapping-Grundlage zur Verfügung [25].



**Abbildung 13:** Zahl der differentiell exprimierten Gene im Sortenvergleich unter unterschiedlichen Behandlungen. Zu jedem experimentellen Zeitpunkt wurde die Genexpression beider Sorten verglichen, und signifikant unterschiedliche Gene ( $P_{adj} < 0,05$ ,  $SLR > 1$ ) wurden gezählt. Gene, die unter beiden Bedingungen (d. h. Kontrolle und Hypoxie) signifikant unterschiedlich exprimiert waren, sind heller unterlegt. **A:** Experiment in Erdkultur unter Überflutung. **B:** Experiment in Hydrokultur mit Hypoxie im Wurzelbereich.

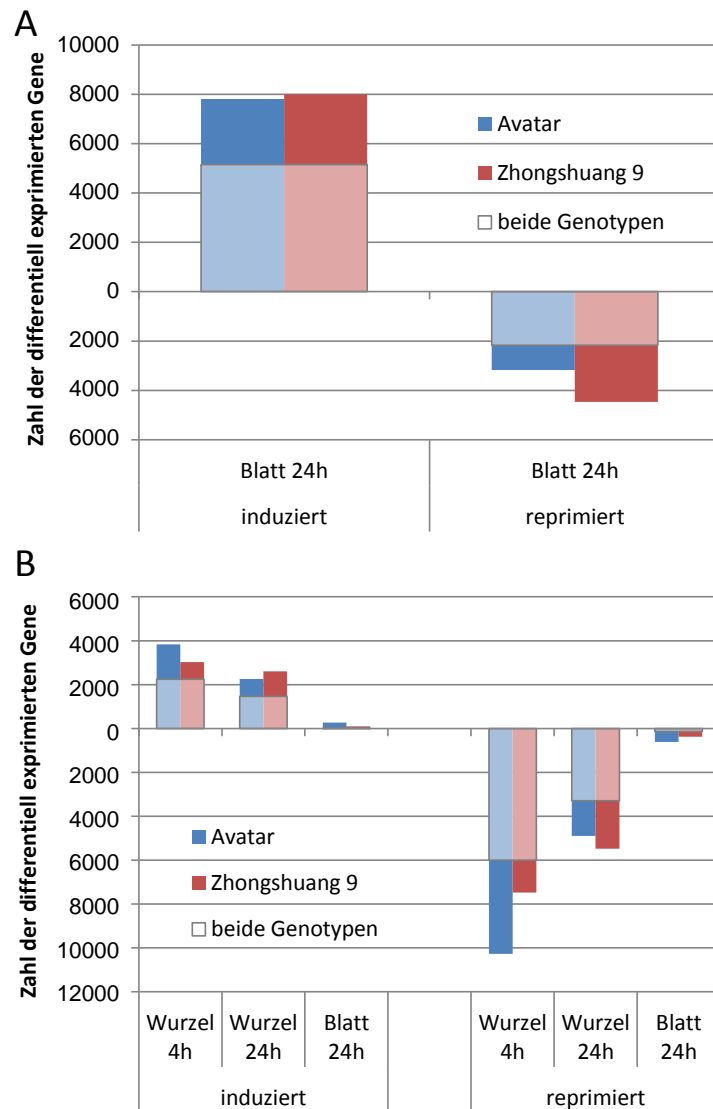
**Tabelle 1:** Zahl der differentiell exprimierten Gene im Sorten-Vergleich unter unterschiedlichen Behandlungen. Zu den Details siehe Abbildung 13. Außerdem sind überlappende Gene aufgeführt. In allen 8 Varianten waren 1070 Gene höher exprimiert in Avatar als in Zhongshuang 9, und 399 Gene höher exprimiert in Zhongshuang 9 als in Avatar.

Sorte	Avatar				Zhongshuang 9			
	Wurzel 4h Hyp	Wurzel 24h Hyp	Blatt 24h Hyp	Blatt 24h Sub	Wurzel 4h Hyp	Wurzel 24h Hyp	Blatt 24h Hyp	Blatt 24h Sub
Kontrolle	5416	4950	3270	3094	2356	2002	2106	1682
Stress	5119	5973	4123	3992	2841	2396	2459	2679
Stress+Kontrolle	3766	3893	2505	2028	1502	1281	1255	948
pro Organ	3031		1518		1006		693	
Gesamt	1070				399			

Auf die Stressbehandlung reagierten beide Sorten weitgehend ähnlich. Überflutung führte nach 24 h zu einer Induktion von ca. 8000 Genen pro Genotyp in den Blättern, mit 5000 Genen, die in beiden Genotypen induziert wurden (Abbildung 14A). Hierzu zählten z.B. Gene, die bei Energiemangel induziert werden, wie Myo-Inositol-Oxygenasen und „Dormant-associated Proteins“. Interessanterweise wurden in der Sorte Zhongshuang 9 viele diese Anzeiger für Kohlenhydratmangel stärker induziert als in der Sorte Avatar. Klassische Hypoxie-Markergene [26] wurden nur zu einem Teil induziert, weil die Ernte im Licht erfolgte. Selbst in überfluteten Pflanzen kann im Licht etwas Sauerstoff durch Photosynthese bereitgestellt werden, wodurch es tagsüber nicht zu einem akuten Sauerstoffmangel kommt [27]. Etwa 3000 – 4000 Gene wurden durch Überflutung reprimiert, häufig Gene, die für biosynthetische Enzyme kodieren. Diese Beobachtungen sprechen sehr wohl für ein Problem mit der Energieversorgung bei Überflutung.

Während der Behandlung dieser Pflanzen fiel auf, dass es Unterschiede in der Gasfilm-Ausbildung auf den Blättern unter Wasser gab. Durch Oberflächenstrukturen bleibt eine Zeitlang ein Gasfilm auf den Blättern zurück, der Gasaustausch unter Wasser verbessern kann [3], [6]. Diese Beobachtungen konnten durch nachfolgende physiologische Messungen verifiziert werden (Abbildung 15). Avatar war in der Lage, für ca. 24 h einen Gasfilm unter Wasser auszubilden, während der Gasfilm bei Zhongshuang 9 kaum sichtbar und messbar war. Dennoch gab es keine signifikanten Unterschiede in der Photosyntheserate unter Wasser. Dies deckt sich mit früheren Beobachtungen, dass Gasfilme nicht notwendigerweise Überflutungstoleranz bedeuten [28]. Weitere physiologische Experimente sind zu diesem Thema geplant, z. B. Zuckermessungen. Ob diese Beobachtung eine Ursache für die Unterschiede in der Genexpression beider Sorten ist, bzw. wie diese Unterschiede molekular verursacht

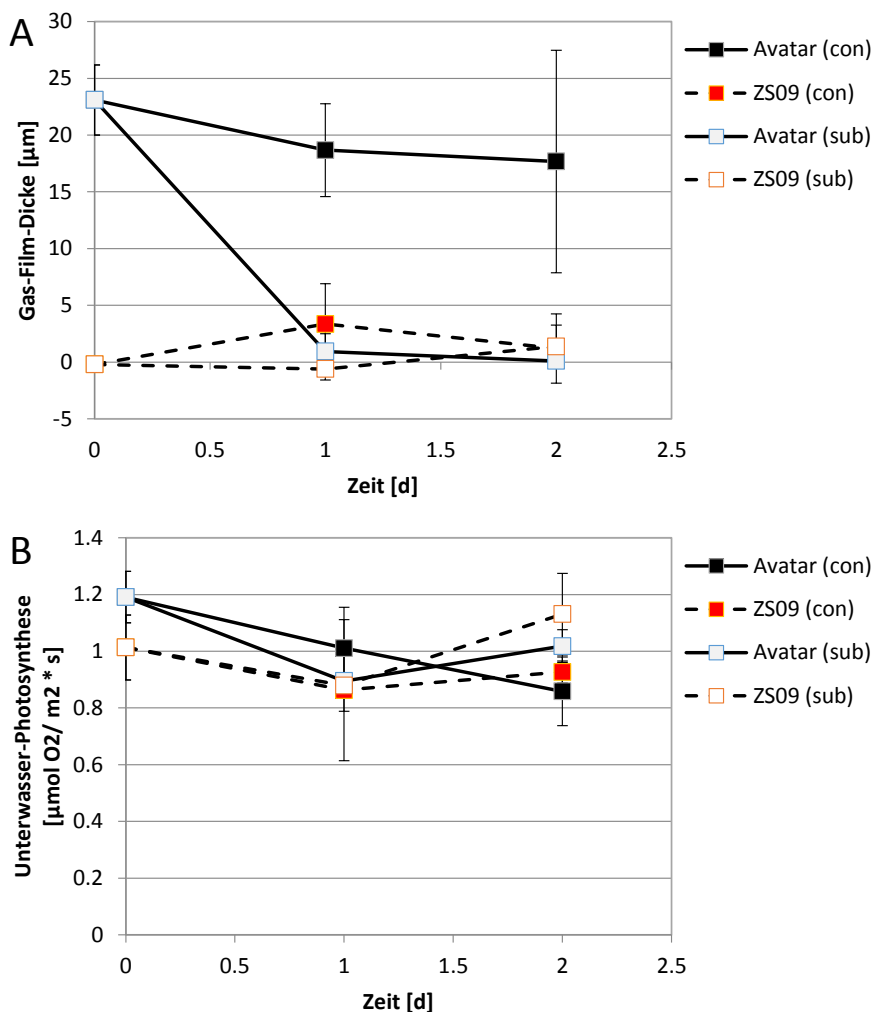
werden, wird Ziel künftiger Untersuchungen sein. Kürzlich wurde für Reis ein Gen beschrieben, das in der Formierung eines Gasfilmes involviert ist [6], dessen Homolog ist aber in unseren Raps-Daten nicht differentiell exprimiert.



**Abbildung 14:** Zahl der differentiell exprimierten Gene als Reaktion auf Stress. Zu jedem experimentellen Zeitpunkt wurde die Genexpression eines Organs unter Kontroll- und Stressbedingungen miteinander verglichen, und signifikant unterschiedliche Gene ( $P_{adj} < 0,05$ ,  $SLR > 1$ ) wurden gezählt. Gene, die in beiden Genotypen signifikant unterschiedlich exprimiert waren, sind heller unterlegt. **A:** Experiment in Erdkultur unter Überflutung. **B:** Experiment in Hydrokultur mit Hypoxie im Wurzelbereich.

Bei Betrachtung der Experimente in Hydrokultur, bei der die Wurzeln mit Sauerstoffmangel behandelt wurden, ergab sich ein komplett anderes Bild. Sehr viel mehr Gene wurden reprimiert als induziert (Abbildung 14B), jedoch auch mit einer großen Übereinstimmung zwischen beiden Sorten. Hier fanden sich in den Wurzeln alle klassischen Hypoxie-Marker-Gene stärker exprimiert als unter Belüftung, z. B. die Raps-Orthologe zu den Arabidopsis-

Genen ADH1, LBD41 und SRO5 [26]. Von den 47 Hypoxie-Marker-Genen aus Arabidopsis, für die Orthologe in Raps existieren, wurden 41 - 43 auch in Rapswurzeln induziert. Verschiedene Transporter waren dagegen stark verringert exprimiert. Genauere funktionale Analysen sowie der Vergleich der beiden Genotypen werden folgen, ebenso wie qPCR-Experimente zur Bestätigung der Expressionsdaten und physiologische Experimente (Zuckermessungen, Enzymaktivitäten). Die Blätter aus gestressten Pflanzen, die sich in diesem System in der Luft befanden, zeigten nur eine geringe Anzahl an differentiell exprimierten Genen (Abbildung 14B), darunter keines der Hypoxie-Marker-Gene.



**Abbildung 15:** Raps unter Überflutung. A: Dicke des Gasfilms auf den Blättern. B: Netto-Unterwasser-Photosynthese. con: Kontrolle, sub: Überflutung. Daten sind Mittelwerte +/- Standardabweichung aus 4 Replikaten. Daten wurden erhoben von Ole Pederson und Dennis Konnerup (Universität Kopenhagen, Dänemark).

Ein Vergleich mit bereits publizierten Daten aus Raps wird demnächst erfolgen. Drei Datensätze existieren dazu [13], [14], [15]. Bisher sind nur wenige Genexpressionsdaten verfügbar, und diese wurden nicht gegen das neue Raps-Genom gemappt [23], sondern gegen ein früheres Genom von *Brassica rapa* (Rübsen), einem nahen Verwandten von Raps. In weite-

ren Schritten sollen die Überflutungsdaten mit den Expressionsdaten anderer Brassicaceae verglichen werden, die bereits verfügbar sind, z. B. von *Arabidopsis thaliana* [29].

#### 4.6 Projekterfolge und deren Verwertbarkeit

Trotz unterschiedlicher Versuchsansätze und Etablierung neuer Testsysteme konnten nicht, wie ursprünglich erwartet, große und reproduzierbare Unterschiede in der Toleranz zwischen verschiedenen Rapsorten festgestellt werden. Die verwendeten Linien waren entweder in ihrer Gensequenz nicht variabel genug, oder es existieren bei Raps keine Sorten mit erhöhter Staunässetoleranz. Bereits beschriebene Unterschiede in der Toleranz asiatischer Rapsorten konnten in unseren Versuchsansätzen nicht bestätigt werden.

Im Laufe des Projekts wurden jedoch Systeme für die Verwendung in Klimakammern entwickelt, um Staunässetoleranz verschiedener Sorten zu testen. Mit diesen Testsystemen kann nun eine Raps-Kollektion mit größtmöglicher genetischer Vielfalt [21] hinsichtlich ihrer Staunässeempfindlichkeit überprüft werden. Eine weitere Möglichkeit, um nach möglichen Staunässe-Toleranzmechanismen zu suchen, bestünde darin, auf nahe verwandte *Brassica*-Arten zurückzugreifen [30].

Die Analyse der Genexpression von Raps unter Staunässe und Überflutung war dagegen erfolgreich und zeigte viele differentiell exprimierte Gene auf. Aufgrund der fehlenden Unterschiede in der Staunässetoleranz der im Rahmen des Projekts getesteten Rapsorten wurden eine in Bayern angebaute und eine asiatische Sorte für den Vergleich der transkriptionellen Antwort auf Staunässe und Überflutung ausgewählt. Erste Ergebnisse zeigen bereits, dass es Unterschiede zwischen beiden Sorten gibt.

In den letzten Jahren gab es auf dem Gebiet der Erforschung der Reaktionen der Pflanzen auf Staunässe und Überflutung große Fortschritte. Dies beruht jedoch hauptsächlich auf Erkenntnissen aus der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana*. Viele Ansätze versuchten bisher, die Staunässetoleranz von Kulturpflanzen zu erhöhen, z. B. bei Mais, Gerste, Sojabohne und auch Raps. Unzählige Sortenscreens wurden durchgeführt, aber nur wenige haben bisher zu greifbaren molekularen Markern für Überflutungstoleranz geführt, insbesondere bei Reis. Dies liegt unter anderem daran, dass für viele Pflanzenarten die molekularen Mechanismen der Stressreaktionen noch nicht bekannt und schon gar nicht verstanden sind, wie ich es kürzlich in einem Übersichtsartikel zusammengefasst habe [30].

Dieses Projekt hat hier einen großen Beitrag geleistet, indem die molekularen Antworten von Raps auf Staunässe und Überflutung erstmalig umfangreich charakterisiert worden sind. Sie bilden die Grundlage für weitergehende Experimente zur Identifizierung spezifischer Toleranzfaktoren, gezielte Sortenscreens und züchterische Ansätze. Ein Sortenscreen ist nur dann erfolgreich, wenn nach spezifischen Toleranzfaktoren gesucht wird, diese sind für Raps bisher noch gar nicht bekannt [30]. Da für die Zukunft neben langen Trockenperioden, wie gerade im Sommer 2018 in Bayern und ganz Mitteleuropa, auch Starkregenereignisse zu nehmen werden, wie z. B. 2016 in Bayern oder aktuell im Herbst 2018 in Italien, sind weitere Anstrengungen nötig, um langfristig Kulturpflanzen für den Klimawandel fit zu machen.

## 5 Veröffentlichungen im Rahmen des Projekts

### Publikationen:

Mustroph, A. (2018) Improving Flooding Tolerance of Crop Plants, *Agronomy* 8: 160

Bammer, B., Wittig, P., Selle, M, Mustroph, A. (in Vorbereitung) The transcriptional response of two *Brassica napus* cultivars to submergence

### Vorträge:

Bammer, B., Selle, M., Mustroph, A. (2017): Toleranz gegenüber Staunässe und Überflutung bei Raps. Zwischenbilanz und Fachtagung PV BayKlimaFit, Martinsried, Oktober 2017

Mustroph, A. (2016): Wenn Pflanzen die Luft ausgeht: (Über)leben ohne Sauerstoff. Landesgartenschau, Bayreuth, Juni 2016

Mustroph, A. (2016): Toleranz gegenüber Staunässe und Überflutung bei Raps. Auftaktveranstaltung PV BayKlimaFit, München, April 2016

### Posterbeiträge:

Bammer, B., Selle, M., Mustroph, A. (2018) Effects of waterlogging and submergence in different cultivars of *Brassica napus*. Profildtagung "Molekulare Biowissenschaften", Universität Bayreuth, Mai 2018

Bammer, B., Selle, M., Mustroph, A. (2017): Toleranz gegenüber Staunässe und Überflutung bei Raps. Zwischenbilanz und Fachtagung PV BayKlimaFit, Martinsried, Oktober 2017

Bammer, B., Mustroph, A. (2016) Effects of waterlogging and submergence in different cultivars of *Brassica napus*. 7. BZMB Graduiertensymposium der Universität Bayreuth, Selb, September 2016

Mustroph, A., Bammer, B. (2016): Toleranz gegenüber Staunässe und Überflutung bei Raps. Auftaktveranstaltung PV BayKlimaFit, München, April 2016

## 6 Vernetzungen

Nur wenige Arbeitsgruppen auf der Welt arbeiten mit Raps unter Staunässe. Im Zuge dieses Projekts wurde mit der in Bezug auf das Forschungsthema führenden Arbeitsgruppe am „Oil Crops Research Institute of the Chinese Academy of Agricultural Sciences“ in Wuhan, China Kontakt aufgenommen. Zu einer konkreten Kooperation kam es bisher nicht, wir konnten jedoch Samen der beiden oft verwendeten asiatischen Genotypen Zhongshuang 9 und GH01 bekommen [13], [14], [16]. Weiterhin erhielten wir Samen anderer chinesischer Sorten von einer deutschen Arbeitsgruppe an der Justus-Liebig-Universität Gießen durch Professor Rod Snowdon und Lunwen Qian, die sich ebenfalls mit Raps beschäftigt, jedoch mit einer

anderen Fragestellung [31]. Die europäischen Rapsorten erhielten wir von Alois Aigner von der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft.

Im Rahmen dieses Projekts wurde außerdem Kontakt aufgenommen mit einer Gruppe an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel um Professor Dr. Karl Mühling, die sich erst seit kurzem mit Raps unter Staunässe beschäftigt [22]. In Zukunft soll es hier Gespräche über eine mögliche Zusammenarbeit geben.

Durch die Beobachtung eines Unterschiedes in der Ausbildung von Gasfilmen unter Wasser bei verschiedenen Rapsorten wurde eine Zusammenarbeit mit Professor Ole Pedersen (Universität Kopenhagen, Dänemark) begonnen, der uns bei der Erhebung physiologischer Daten (siehe Abbildung 15) behilflich war. Eine bereits bestehende Kooperation mit einer Arbeitsgruppe an der Universität Utrecht um Rens Voeselek und Rashmi Sasidharan beinhaltet unter anderem die Analyse der molekularen Reaktionen von überflutungstoleranten Brassicaceae, die bei der Datenanalyse mit verwendet werden.

## **7 Bestehende und entstandene Industriebeteiligung/-en**

Nach Bekanntwerden des Projekts hatten zwei Saatgutfirmen Interesse an den Arbeiten gezeigt (Deutsche Saatveredlung AG; Norddeutsche Pflanzenzucht Hans-Georg Lembke KG). Bisher ist es noch zu keiner konkreten Zusammenarbeit gekommen.

Durch die Beobachtung der geringen Variabilität der uns zur Verfügung stehenden Rapsorten bei Staunässe wurde 2018 eine Gruppe aus Gatersleben um Uwe Scholz kontaktiert, um eine dort etablierte Kollektion von Rapsorten zu nutzen. Der Kontakt führte letztendlich zurück zu zwei Saatgutfirmen (KWS Saat AG, Einbeck und NPZ Innovation GmbH, Holtsee), die bereits vorher Interesse gezeigt hatten. Es wurde besprochen, dass diese sehr diverse Kollektion auf Staunässetoleranz hin untersucht werden könnte. Im Rahmen dieses Projekts war dies nicht mehr möglich.

## **8 Zusammenfassung**

Starkregenereignisse, die zu Überflutungen und Staunässe in landwirtschaftlichen Kulturen führen, werden klimawandelbedingt in den nächsten Jahren zunehmen. Laut des Klima-Reportes Bayern 2015 sind bereits in den letzten Jahren Hochwasserereignisse verstärkt in Bayern aufgetreten, sie werden in den folgenden Jahren insbesondere im Winterhalbjahr noch zunehmen. Staunässe gehört zu den Stressfaktoren bei Pflanzen, der zu großen Ernteeinbußen in der Landwirtschaft führt, wobei alle mitteleuropäischen Kulturpflanzen betroffen sind. Daneben verursachen Hochwasserereignisse auch Bodenerosion und Kontamination der Böden durch angeschwemmte Schadstoffe. Bisher konnten jedoch nur wenige Fortschritte erzielt werden, um Kulturpflanzen besser an diesen Stress anzupassen. Dies geschah bisher insbesondere beim ohnehin toleranten Reis.



Dieses Projekt hatte zum Ziel, Möglichkeiten aufzuzeigen, wie die besonders empfindlichen Rapspflanzen an den Klimawandel, insbesondere an zunehmende Starkregenereignisse, angepasst werden könnten. Raps gewinnt immer mehr an Bedeutung als Energie- und Nahrungsquelle. Er ist jedoch nicht in der Lage, Stoffwechsel und Morphologie so umzustellen, dass ein Überflutungsstress überlebt werden kann. Im Laufe des Projekts sollten Ursachen für die hohe Überflutungsempfindlichkeit von Raps im Vergleich zu anderen Pflanzenarten ermittelt werden. Daneben sollte die Bandbreite der Toleranz gegenüber Staunässe von in Bayern etablierten Varietäten ermittelt werden, um Sorten mit einem Potential für erhöhte Staunäsetoleranz zu finden. Im Vergleich dazu wurden asiatische Rapsorten einbezogen, die als staunäsetolerant publiziert worden sind.

In den ersten zwei Jahren des Projekts wurden mit 18 bayerischen Rapsorten und 7 asiatische Sorten Screening-Experimente durchgeführt, um Unterschiede in der Staunäsetoleranz zu ermitteln. Dabei wurden Experimente im Gewächshaus an 6 Wochen alten Rapspflanzen durchgeführt sowie an jungen Pflanzen in der Klimakammer und an keimenden Samen. Neben Wachstumsparametern wurden auch ADH-Aktivitäten in Wurzeln der Pflanzen bestimmt. Die Ergebnisse zeigten starke Schwankungen zwischen Individuen, auch gab es Unterschiede bei den Screeningmethoden. Aus diesem Grund konnte keine der europäischen Sorten als reproduzierbar toleranter oder sensitiver beschrieben werden. Auch nicht alle als tolerant bzw. sensitiv eingestuften asiatischen Sorten konnten wir bestätigen.

Im dritten Jahr des Projekts wurden zwei Sorten ausgewählt, eine europäische Winterrapssorte und eine asiatische Semi-Winterrapssorte. Deutliche Unterschiede in der Toleranz zwischen diesen Sorten konnten wir bisher nicht beobachten. Für diese Sorten wurde nach Behandlung mit Staunässe und Überflutung die molekulare Stressantwort mit Hilfe der RNA-Sequenzierung analysiert. Die Auswertung der Daten dauert noch an. Deutliche Stressreaktionen sind in beiden Genotypen zu beobachten, die Daten werden dazu dienen, die allgemeine Antwort von Raps auf Sauerstoffmangel zu zeigen. Ebenso gibt es Unterschiede zwischen den Sorten, die noch funktionell charakterisiert werden müssen, und die eventuell in Zusammenhang gebracht werden können mit Unterschieden in der Reaktion auf Staunässe und Überflutung.

## 9 Ausblick

Obwohl das Projekt neue Erkenntnisse zu Raps unter Staunässe gebracht hat, muss noch sehr viel mehr in diese Forschung investiert werden, um für die Landwirtschaft nutzbare Ergebnisse zu liefern. Nach vollständiger Auswertung der Daten wird sich sagen lassen, ob die beiden ausgewählten Genotypen unterschiedliche Toleranzmechanismen bei Staunässe oder Überflutung zeigen. Sollte dies der Fall sein, können diese Mechanismen bei weiteren Sorten analysiert und charakterisiert werden, um langfristig eine züchterische Verbesserung der Toleranz von Raps gegenüber Staunässe und Überflutung zu ermöglichen.

## Literaturverzeichnis

- [1] van Dongen, J.T., Licausi, F. (2015) Oxygen sensing and signaling. *Annu Rev Plant Biol* 66: 345-367
- [2] Voesenek, L.A., Bailey-Serres, J. (2015) Flood adaptive traits and processes: an overview. *New Phytol* 206: 57-73
- [3] Mustroph, A., Steffens, B., Sasidharan, R. (2018) Signalling Interactions in Flooding Tolerance. *Annual Plant Reviews Online* 2
- [4] Yamauchi, T., Colmer, T.D., Pedersen, O., Nakazono, M. (2018) Regulation of root traits for internal aeration and tolerance to soil waterlogging-flooding stress. *Plant Physiology* 176: 1118–1130
- [5] Sasidharan, R., Voesenek, L.A. (2015) Ethylene-mediated acclimations to flooding stress. *Plant Physiol.* 169: 3-12
- [6] Kurokawa Y, Nagai K, Huan PD, et al. (2018) Rice leaf hydrophobicity and gas films are conferred by a wax synthesis gene (LGF1) and contribute to flood tolerance. *New Phytologist* 218 (4): 1558–1569
- [7] Gibbs, D.J., Lee, S.C., Isa, N.M., et al. (2011). Homeostatic response to hypoxia is regulated by the N-end rule pathway in plants. *Nature* 479: 415-418
- [8] Licausi, F., Kosmacz, M., Weits, D.A., et al. (2011). Oxygen sensing in plants is mediated by an N-end rule pathway for protein destabilization. *Nature* 479: 419-422
- [9] Gasch, P., Funderinger, M., Müller, J.T., 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. *Plant Cell* 28: 160-180
- [10] White, M.D., Klecker, M., Hopkinson, R.J., et al. (2017) Plant cysteine oxidases are dioxygenases that directly enable arginyl transferase-catalysed arginylation of N-end rule targets. *Nat Commun.* 8: 14690
- [11] White, M.D., Kamps, J.J.A.G., East, S., Taylor Kearney, L.J., Flashman, E. (2018) The plant cysteine oxidases from Arabidopsis thaliana are kinetically tailored to act as oxygen sensors. *J Biol Chem.* 293: 11786-11795
- [12] Voesenek, L.A., Armstrong, W., Bogemann, G.M., Colmer, T.D. (1999) A lack of aerenchyma and high rates of radial oxygen loss from the root base contribute to waterlogging intolerance in *Brassica napus*. *Funct Plant Biol* 26: 87-93
- [13] Zou, X.L., Tan, X.Y., Hu, C.W., et al. (2013) The transcriptome of Brassica napus L. roots under waterlogging at the seedling stage. *Int J Mol Sci* 14: 2637-2651

- [14] Zou, X.L., Zeng, L., Lu, G.Y., Cheng, Y., Xu, J.S., Zhang, X.K. (2015) Comparison of transcriptomes undergoing waterlogging at the seedling stage between tolerant and sensitive varieties of *Brassica napus* L.. J Integr Agric 14: 1723-1734
- [15] Lee, Y.H., Kim, K.S., Jang, Y.S., Hwang, J.H., Lee, D.H., Choi, I.H. (2014) Global gene expression responses to waterlogging in leaves of rape seedlings. Plant Cell Rep 33: 289-299
- [16] Xu, J., Qiao, X., Tian, Z., et al. (2018) Proteomic Analysis of Rapeseed Root Response to Waterlogging Stress. Plants (Basel) 7. pii: E71
- [17] Mustroph, A., Albrecht, G. (2003) Tolerance of crop plants to oxygen deficiency stress: Fermentative activity and photosynthetic capacity of entire seedlings under hypoxia and anoxia. Physiol Plant 117: 508-520
- [18] Zou, X.L., Hu, C.W., Zeng, L., Cheng, Y., Xu, M.Y., Zhang, X.K. (2014) A comparison of screening methods to identify waterlogging tolerance in the field in *Brassica napus* L. during plant ontogeny. PLoS One 9: e89731
- [19] Xu, M., Ma, H., Zeng, L., et al. (2015) The effect of waterlogging on yield and seed quality at the early flowering stage in *Brassica napus* L. Field Crops Res 180: 238-245
- [20] Zou, X.L., Cong, Y., Cheng, Y., Lu, G.Y., Zhang, X.K. (2013) Screening and Identification of Waterlogging Tolerant Rapeseed (*Brassica napus* L.) During Germination Stage. Intelligent System Design and Engineering Applications (ISDEA), 2013 Third International Conference
- [21] Schmutzer, T., Samans, B., Dyrzka, E., et al. (2015) Species-wide genome sequence and nucleotide polymorphisms from the model allopolyploid plant *Brassica napus*. Sci Data 2: 150072.
- [22] Wollmer, A.-C., Pitann, B., Mühling, K.H. (2018) Waterlogging events during stem elongation or flowering affect yield of oilseed rape (*Brassica napus* L.) but not seed quality. J Agro Crop Sci 204: 165-174
- [23] Chalhoub, B., Denoeud, F., Liu, S., et al. (2014) Plant genetics. Early allopolyploid evolution in the post-Neolithic *Brassica napus* oilseed genome. Science 345: 950-953
- [24] Xu, B., Cheng, Y., Zou, X.L., Zhang, X.K. (2016) Ethanol content in plants of *Brassica napus* L. correlated with waterlogging tolerance index and regulated by lactate dehydrogenase and citrate synthase. Acta Physiol Plant 38: 81
- [25] Sun, F., Fan, G., Hu, Q., et al. (2017) The high-quality genome of *Brassica napus* cultivar 'ZS11' reveals the introgression history in semi-winter morphotype. Plant J 92: 452-468
- [26] Mustroph, A., Zanetti, M.E., Jang, C.J., et al. (2009) Profiling transcriptomes of discrete cell populations resolves altered cellular priorities during hypoxia in Arabidopsis. Proc Natl Acad Sci U S A 106: 18843-18848

- [27] Lee, S.C., Mustroph, A., Sasidharan, R., Vashisht, D., Pedersen, O., Oosumi, T., Voeselek, L.A., Bailey-Serres, J. (2011) Molecular characterization of the submergence response of the *Arabidopsis thaliana* ecotype Columbia. *New Phytol* 190: 457-471
- [28] Winkel, A., Visser, E.J., Colmer, T.D., Brodersen, K.P., Voeselek, L.A., Sand-Jensen, K., Pedersen, O. (2016) Leaf gas films, underwater photosynthesis and plant species distributions in a flood gradient. *Plant Cell Environ* 39: 1537-1548
- [29] van Veen, H., Vashisht, D., Akman, M., et al. (2016) Transcriptomes of eight *Arabidopsis thaliana* accessions reveal core conserved, genotype- and organ-specific responses to flooding stress. *Plant Physiol* 172: 668-689
- [30] Mustroph, A. (2018) Improving Flooding Tolerance of Crop Plants, *Agronomy* 8: 160
- [31] Qian, L., Voss-Fels, K., Cui, Y., Jan, H.U., Samans, B., Obermeier, C., Qian, W., Snowdon, R.J. (2016) Deletion of a Stay-Green Gene Associates with Adaptive Selection in *Brassica napus*. *Mol Plant* 9: 1559-1569

## Abkürzungsverzeichnis

ADH: Alkohol-Dehydrogenase

ANOVA: analysis of variance (Varianzanalyse)

LBD41: LOB domain-containing protein 41 (At3g02550)

*P*: probability value (Signifikanzwert zur Varianzanalyse)

*P*<sub>adj</sub>: an Mehrfachvergleiche angepasster Signifikanzwert

qPCR: quantitative polymerase chain reaction

SLR: signal-log ratio, log<sub>2</sub>(Stress/Kontrolle)

SRO5: similar to RCD one 5 (At5g62520)

Tukey HSD: Tukey's Honestly Significant Difference test (post-hoc-Test zur Varianzanalyse)

## Anhang

**Tabelle 2:** Verwendete Rapssorten im Screening (Landessortenversuch 2015, Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft).

<b>Sorte</b>	<b>Sorte</b>
Andromeda	Mentor
Armstrong	Mercedes
Avatar	Penn
Comfort	PR46W20
Flyer	PR46W26
Frodo KWS	Raffiness
Genie	Raptor
Marathon	SY Saveo
Medea	SY Vesuvio

**Tabelle 3:** Asiatische Rapssorten, die uns für Experimente zur Verfügung standen

<b>Sorte</b>	<b>Bezeichnung</b>
GH01	GH01
Zhongyou 821	SW 080
Zhongyouza 2	SW 082
Zhongshuang 8	SW 078
Zhongshuang 9	SW 079
Zhongshuang 10	SW 083
Xiangyou 13	SW 064

**Tabelle 4:** Statistiken für das RNAseq-Experiment. S = Spross; R = Wurzel; AV = Avatar; ZS = Zhongshuang 9; C = Kontrolle Erde; Sub = Überflutung; KL = Kontrolle Hydrokultur; WL = Hypoxie/ Staunässe.

Probe	Replikat	# Reads	# Reads Aligned	% Reads Aligned
SAV	C1	39.448.259	31.350.254	79,47
SAV	C3	35.919.013	28.598.805	79,62
SAV	C4	41.707.920	33.134.483	79,44
SZS	C1	38.771.868	29.228.255	75,39
SZS	C3	47.806.408	35.873.198	75,04
SZS	C4	45.220.257	34.014.030	75,22
SAV	Sub1	45.109.818	35.487.107	78,67
SAV	Sub3	39.880.397	31.575.378	79,18
SAV	Sub4	44.621.915	35.170.405	78,82
SZS	Sub1	48.414.083	35.429.424	73,18
SZS	Sub3	40.383.866	30.084.960	74,50
SZS	Sub4	32.644.744	24.389.812	74,71
RAV4h	KL1	43.992.359	33.784.418	76,80
RAV4h	KL3	40.192.242	31.345.135	77,99
RAV4h	KL5	50.412.905	38.325.429	76,02
RSZ4h	KL1	32.961.155	24.068.346	73,02
RSZ4h	KL3	34.127.518	25.013.008	73,29
RSZ4h	KL5	44.715.022	32.734.834	73,21
RAV4h	WL1	37.168.710	28.783.062	77,44
RAV4h	WL3	46.990.718	37.018.301	78,78
RAV4h	WL4	40.851.758	31.428.802	76,93
RSZ4h	WL1	41.702.657	30.556.804	73,27
RSZ4h	WL3	34.478.682	25.055.694	72,67
RZS4h	WL4	36.893.786	26.712.900	72,40
RAV24h	KL1	36.186.672	28.087.275	77,62
RAV24h	KL3	35.381.381	27.486.750	77,69
RAV24h	KL5	38.514.910	29.439.232	76,44
RSZ24h	KL1	32.907.604	23.779.142	72,26
RSZ24h	KL3	39.743.147	28.828.848	72,54
RSZ24h	KL5	47.066.514	33.934.003	72,10

---

RAV24h	WL1	39.695.655	30.527.739	76,90
RAV24h	WL3	29.796.262	22.880.654	76,79
RAV24h	WL4	39.311.539	30.753.977	78,23
RSZ24h	WL1	30.905.560	21.609.928	69,92
RSZ24h	WL3	34.682.200	24.645.497	71,06
RZS24h	WL4	39.586.148	26.838.484	67,80
SAV24h	KL1	36.898.737	29.529.720	80,03
SAV24h	KL3	51.962.111	41.333.016	79,54
SAV24h	KL5	31.399.817	24.945.301	79,44
SZS24h	KL1	49.788.926	36.769.768	73,85
SZS24h	KL3	32.186.216	24.452.001	75,97
SZS24h	KL5	48.459.487	36.586.905	75,50
SAV24h	WL1	34.533.071	27.515.561	79,68
SAV24h	WL3	43.413.220	34.802.114	80,16
SAV24h	WL4	45.219.308	35.364.701	78,21
SZS24h	WL1	33.474.630	25.242.878	75,41
SZS24h	WL3	32.215.368	24.233.347	75,22
SZS24h	WL4	32.077.630	24.012.054	74,86