

**Heterosis assoziierte Genexpression**  
**in frühen Entwicklungsstadien von**  
*Zea mays* L.

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades  
des Departments Biologie der Fakultät für Mathematik,  
Informatik und Naturwissenschaften  
der Universität Hamburg

vorgelegt von  
**Stephanie Meyer**  
aus Bienenbüttel

Hamburg, 2007

Genehmigt vom Department Biologie  
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften  
an der Universität Hamburg  
auf Antrag von Professor Dr. E. KRANZ  
Weiterer Gutachter der Dissertation:  
Herr Professor Dr. U. WIENAND  
Tag der Disputation: 11. Mai 2007

Hamburg, den 23. April 2007



Professor Dr. Reinhard Lieberei  
Leiter des Departments Biologie

Diese Arbeit wurde an der Universität Hamburg am Biozentrum Klein Flottbek in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Erhard Kranz, Abteilung Entwicklungsbiologie und Biotechnologie, durchgeführt und von Herrn Dr. Stefan Scholten betreut.

1. Dissertationsgutachter: Prof. Dr. Erhard Kranz, Universität Hamburg
2. Dissertationsgutachter: Prof. Dr. Udo Wienand, Universität Hamburg

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits veröffentlicht bzw. auf Kongressen präsentiert:

**Lê, Q., Gutiérrez-Marcos, J., Costa, L. M., Meyer, S., Dickinson, H., Lörz, H., Kranz, E., Scholten, S.** (2005) Construction and screening of subtracted cDNA libraries from limited populations of plant cells: a comparative analysis of gene expression between maize egg cells and central cells. *The Plant Journal* 44:167-178

**Meyer, S., Pospisil, H., Scholten, S.** (2007) Heterosis associated gene expression in maize embryo six days after fertilization exhibits additive, dominant and overdominant pattern. *Plant Mol Biol* 63:381-391

**Meyer, S. und Scholten, S.** Equal parental contribution to early plant zygotic development. (eingereichtes Manuskript)

Meeting COST 853: Agricultural Biomarkers for Array-Technology, 16.08.-17.08.2004, Helsinki, Finnland

8<sup>th</sup> Gatersleben Research Conference: Genetic Diversity & Genome Dynamics in Plants, 03.06-06.06.2005, Gatersleben, Deutschland

Symposium des DFG-Schwerpunktprogramms 1149: Heterosis in Plants, 18.05-20.05.2006, Potsdam-Golm, Deutschland

Plant Genetics Conference: 20.09-23.09.2006, Kiel, Deutschland

# I Inhaltsverzeichnis

<b>I</b>	<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>I</b>
<b>II</b>	<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>III</b>
<b>III</b>	<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>IV</b>
<b>IV</b>	<b>Abkürzungen und Einheiten .....</b>	<b>V</b>
<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1	Heterosis – Anwendung und Grundlagenforschung.....	1
1.2	Genregulation und Chromatinstruktur .....	5
1.3	Pflanzliche Embryogenese.....	7
1.4	Ziele der Arbeit.....	10
<b>2</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>11</b>
2.1	<b>Material .....</b>	<b>11</b>
2.1.1	Pflanzen.....	11
2.1.2	Chemikalien und Enzyme .....	11
2.1.3	Oligonukleotide.....	11
2.1.4	Bakterien und Plasmide.....	14
2.1.5	Größenstandards.....	14
2.1.6	Software zur Sequenzanalyse und Datenbanken .....	14
2.2	<b>Methoden.....</b>	<b>14</b>
2.2.1	Anzucht und Kreuzung von <i>Zea mays</i> .....	14
2.2.2	Isolation von Pflanzengeweben und Längenmessung .....	15
2.2.3	Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie .....	15
2.2.4	Statistische Analyse der phänotypischen Daten .....	16
2.2.5	Allgemeine molekularbiologische Arbeiten .....	16
2.2.6	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) .....	17
2.2.7	cDNA-Synthese.....	17
2.2.8	Suppressive subtraktive Hybridisierung (SSH).....	18
2.2.9	Microarrayproduktion .....	18
2.2.10	Differentielles Screening .....	19
2.2.11	Produktion, Hybridisierung und Analyse des Heterosis-3k-Arrays.....	19
2.2.12	Sequenzanalyse.....	21
2.2.13	Quantitative RT-PCR .....	21
2.2.14	Allelspezifische Expressionsanalysen .....	22
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>26</b>
3.1	<b>Vergleichende phänotypische Charakterisierung von Inzuchtlinien und F1-Hybriden.....</b>	<b>26</b>
3.1.1	Embryo, sechs bzw. acht dap .....	26
3.1.2	Endosperm, sechs dap .....	31
3.2	<b>cDNA-Synthese aus limitiertem Probenmaterial .....</b>	<b>34</b>
3.3	<b>Erzeugung subtrahierter cDNA-Banken .....</b>	<b>34</b>
3.4	<b>Differentielles Screening subtrahierter cDNA-Banken aus sechs dap Embryonen .....</b>	<b>35</b>
3.4.1	Identifikation von differentiell exprimierten Genen.....	36
3.4.2	Sequenzanalyse und funktionelle Klassifikation .....	36
3.4.3	Validierung der Expressionsmuster.....	39
3.5	<b>Genexpressionsanalyse in sechs dap Embryo- und Endospermgewebe.....</b>	<b>40</b>
3.5.1	Produktion und Hybridisierung eines thematisch fokussiertem Microarrays .....	40
3.5.2	Heterosis assoziierte Genexpression in sechs dap Embryo- und Endospermgewebe.....	43
3.5.3	Identifikation von differentiell exprimierten Chromatingenen.....	49
3.5.4	Differentielles Auftreten von transponierbaren Elementen und Transkripten assoziierter Gene ..	52

<b>3.6 Analyse der Heterosis assoziierten Genexpression in sechs dap Embryonen.....</b>	<b>54</b>
3.6.1 Sequenzanalysen von Heterosis assoziierten Genen und funktionelle Klassifikation .....	54
3.6.2 Heterosis assoziierte Expressionsmuster in sechs dap F1-Embryonen.....	59
<b>3.7 Allelspezifische Expressionsanalysen in verschiedenen embryonalen Entwicklungsstadien .....</b>	<b>61</b>
3.7.1 Auswahl und Charakterisierung der allelspezifisch zu untersuchenden Gene .....	61
3.7.2 Expressionsregulation in sechs und acht dap F1-Embryonen .....	64
3.7.3 Paternale Genomaktivierung und allelspezifische Genexpression im Embryo .....	67
<b>4 Diskussion.....</b>	<b>70</b>
4.1 Phänotypisch nachweisbare Manifestierung von Heterosis in der frühen Entwicklung.....	71
4.2 Heterosis assoziierte Genexpression in der frühen Entwicklung.....	75
4.2.1 Techniken zur Analyse der Heterosis assoziierten Genexpression in der frühen Embryogenese .	75
4.2.2 Heterosis assoziierte Genexpression in den untersuchten Genotypkombinationen.....	78
4.2.3 Nachweis der dosisabhängigen Expression sowie des paternalen Einflusses im Endosperm .....	80
4.2.4 Differentielle Expression von regulatorischen Genen ist mit Heterosis assoziiert.....	81
4.2.5 <i>Dwarf8</i> – Indiz für die Beteiligung der hormonellen Regulation an Heterosis .....	84
4.2.6 Chromatingene unterschiedlicher Funktionsklassen zeigen Heterosis assoziierte Expression.....	85
4.2.7 Transposition gibt Hinweise in Bezug auf Stilllegungsmechanismen.....	89
4.2.8 Genregulatorische Interaktionen sind in sechs dap F1-Embryonen nachweislich erhöht.....	91
4.2.9 Möglichkeit zur Initialisierung von Heterosis bereits in der Zygote .....	93
<b>5 Zusammenfassung .....</b>	<b>97</b>
<b>6 Literaturverzeichnis .....</b>	<b>100</b>
<b>7 Anhang.....</b>	<b>111</b>
7.1 Untersuchungen zur allelspezifischen Genexpression .....	111
7.2 Heterosis-3k-Array .....	117
7.3 Differentielle Genexpression .....	118
<b>8 Danksagung .....</b>	<b>123</b>
<b>9 Lebenslauf .....</b>	<b>124</b>

---

## II Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Heterosis in Mais.....	1
Abbildung 2: Züchterisch optimierter Maisertrag .....	2
Abbildung 3: Genetisches Model für Heterosis.....	3
Abbildung 4: Frühe embryonale Entwicklung in <i>Zea mays</i> (nach Randolph, 1936) .....	8
Abbildung 5: Korn von <i>Zea mays</i> , 15 dap.....	9
Abbildung 6: Histologische Färbung eines sechs dap Hybridembryos.....	26
Abbildung 7: Heterosis in sechs dap Embryonen.....	27
Abbildung 8: Erhöhte Wachstumsrate in F1-Hybriden .....	28
Abbildung 9: Entwicklungsunterschied zwischen 8 dap Embryonen der Hybride und parentalen Inzuchtlinien.....	31
Abbildung 10: Sechs dap Inzucht- und F1-Hybridendospermgewebe.....	32
Abbildung 11: Heterosis in sechs dap Endosperm .....	33
Abbildung 12: Optimierung der Zyklenzahl zur Synthese repräsentativer cDNA.....	34
Abbildung 13: Subtrahierte cDNA-Populationen.....	35
Abbildung 14: Funktionelle Klassifikation von differentiell exprimierten Genen des diff. Screenings .....	37
Abbildung 15: Expressionsprofile von 12 differentiell exprimierten Genen des differentiellen Screenings .....	39
Abbildung 16: Heterosis-3k-Array-Design und das verwendete Schema zur Arrayhybridisierung .....	42
Abbildung 17: Differentielle Genexpression in den verschiedenen Genotypkombinationen und Geweben .....	44
Abbildung 18: Genexpression im Embryo- und Endospermgewebe der interpool Genotypkombination .....	48
Abbildung 19: Expressionsmuster von vier Chromatingenen .....	49
Abbildung 20: Differentielle Expression des Gens TF6 in den Inzuchtlinien UH301 und UH005 .....	53
Abbildung 21: Expressionsmuster von <i>Reina</i> und dem Gen TF6 in sechs dap Embryonen .....	54
Abbildung 22: Funktionelle Klassifizierung der charakterisierten, Heterosis assoziierten Gene in Embryonen.....	58
Abbildung 23: Nicht additives Expressionsverhalten ist in 6 dap F1-Embryonen vielfach detektierbar .....	59
Abbildung 24: Allelspezifisch untersuchte Gene zeigen unterschiedlich diff. Expression in UH301 und UH005.....	62
Abbildung 25: Expressionsmuster der allelspezifisch untersuchten Gene in 6 dap Embryonen.....	63
Abbildung 26: Unterschiedliche Regulationseinflüsse in sechs und acht dap F1-Embryonen .....	65
Abbildung 27: Regulationsumstellung in F1-Embryonen .....	66
Abbildung 28: Gleichwertige elterliche Genomaktivität in der frühen Embryonalentwicklung.....	68
Abbildung 29: Allelspezifische Expressionsanalyse in F1-Embryonen der frühen Entwicklung.....	69
Abbildung 30: Heterosis in der frühen Embryonalentwicklung von <i>Zea mays</i> L.....	99

### III Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Kenndaten von drei unterschiedlichen Isolationstagen.....	28
Tabelle 2: Histologische Untersuchung von sechs dap Embryonen und statistische Analyse .....	30
Tabelle 3: Anzahl der differentiell exprimierten Gene des differentiellen Screenings .....	36
Tabelle 4: Identifizierte, differentiell exprimierte cDNAs des differentiellen Screenings.....	38
Tabelle 5: Zusammensetzung des Heterosis-3k-Arrays.....	42
Tabelle 6: Auf der Basis von Microarrayhybridisierungen durchgeführte, direkte Vergleiche .....	43
Tabelle 7: Übersicht über die differentielle Genexpression in sechs dap Embryo- und Endospermgewebe .....	45
Tabelle 8: Expressionsverhalten der differentiell exprimierten Chromatingene in reziproken F1-Hybriden .....	50
Tabelle 9: Differentiell exprimierte Chromatingene.....	51
Tabelle 10: Differentiell exprimierte transponierbare Elemente und assoziierte Gene.....	52
Tabelle 11: Heterosis assoziierte Gene in sechs dap Embryonen der Genotypkombination UH301/UH005 .....	56
Tabelle 12: Expressionsverhalten von 31 differentiell exprimierten Genen in reziproken 6 dap F1-Embryonen .....	60
Tabelle 13: Charakterisierung der allelspezifisch untersuchten Gene auf der Basis von Sequenzhomologien.....	64
Tabelle 14: Steuerung der Genexpression unter heterozygoten Bedingungen.....	67
Tabelle 15: Expressionsniveau der allelspezifisch untersuchten Gene .....	111
Tabelle 16: Übersicht über monoallelische Detektionsgrenzen und Datennormalisierung.....	112
Tabelle 17: Parentale Genomaktivitäten in den frühen Stadien der Embryogenese .....	113
Tabelle 18: Genregulation in sechs und acht dap Hybridembryonen .....	116
Tabelle 19: Charakterisierte Komponenten des Heterosis-3k-Arrays.....	117
Tabelle 20: Differentiell exprimierte Gene in Inzucht-Hybrid-Vergleichen.....	118
Tabelle 21: Microarraydaten der in mehreren Inzucht-Hybrid-Vergleichen detektierten Gene.....	119
Tabelle 22: Differentielle Expression der Chromatingene in der interpool Genotypkombination.....	120
Tabelle 23: Differentielle Expression der Chromatingene in der intrapool Genotypkombination.....	121
Tabelle 24: Differentielles Auftreten von transponierbaren Elementen und assoziierten Genen.....	122

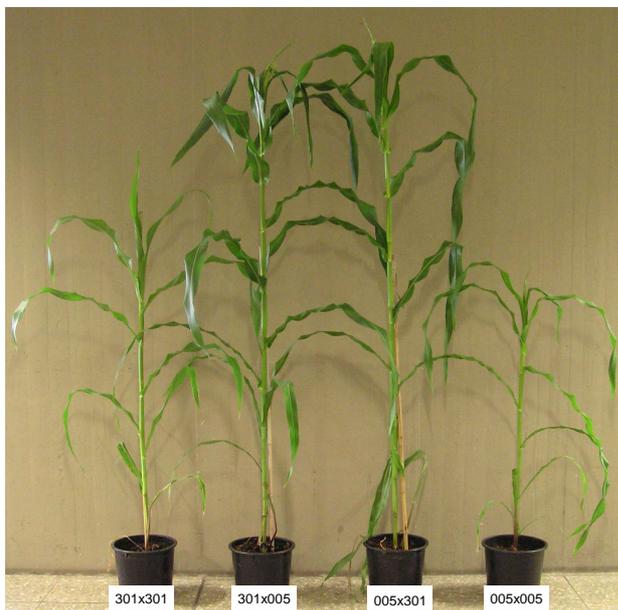
## IV Abkürzungen und Einheiten

µl	Mikroliter	MIPS	Münchener Informationszentrum für <i>Arabidopsis</i> Proteinsequenzen
µm	Mikrometer	MPH	Mid Parent Heterosis
Abb.	Abbildung	n	Anzahl
AG	Arbeitsgruppe	ng	Nanogramm
AGO	Protein der Argonaut Familie	P	Wahrscheinlichkeit (probability)
ATP	Adenosintriphosphat	P <sub>1</sub>	Elter 1 (Parent 1)
BAC	bacterial artificial chromosoms	P <sub>2</sub>	Elter 2 (Parent 2)
BPH	Best Parent Heterosis	P <sub>B</sub>	bester Elter (best Parent)
cDNA	komplementäre DNA	PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion (Polymerase Chain Reaction)
dap	Tage nach der Bestäubung (days after pollination)	P <sub>L</sub>	niedrigster Elter (lowest Parent)
dent	Zahnmaisform	P <sub>M</sub>	mütterlicher Elter (maternal Parent)
DNA	Desoxyribonukleinsäure	qm	Quadratmeter
EMB	Embryo	qRT-PCR	quantitative RT-PCR-Reaktion
END	Endosperm	QTL	Genorte, die quantitative Merkmale bestimmen (Quantitativ Trait Loci)
F1	1. Filialgeneration	r	Korrelation
FDR	false discovery rate	RNA	Ribonukleinsäure
flint	Hartmaisform	RNAse	Ribonuklease
g	Gramm	RT	Reverse Transkription
<i>gai</i>	Gen: Gibberellin insensitive Gen	<i>rubisco</i>	Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase
<i>gapdh</i>	Gen der Glycerinaldehydphosphat- Dehydrogenase	s	Standardabweichung
gDNA	genomische DNA	SIR2	Protein „silent information regulator 2“
<i>gfp</i>	Gen des grün fluoreszierendes Protein	siRNA	Kleine interferierende RNAs (small interfering RNA)
H	Hybrid	SSH	suppressive subtraktive Hybridisierung
h	Stunde	Supsp.	Subspezies
H <sub>0</sub>	Nullhypothese	t	Tonnen
ha	Hektar	Tab.	Tabelle
kb	Kilobasenpaare	UH005	Inzuchtlinie 005x005
kluxh/d	Kilolux-Stunden pro Tag	UH250	Inzuchtlinie 250x250
l	Liter	UH301	Inzuchtlinie 301x301
Log <sub>2</sub>	Logarithmus zur Basis 2	<i>uidA</i>	Gen der β-Glukuronidase
LTR	Lange terminale Wiederholungen (long terminal repeats)	vs	versus
MALDI-TOF: Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight			
max.	maximal		
MH	Maternal Heterosis		
Mio.	Millionen		

# 1 Einleitung

## 1.1 Heterosis – Anwendung und Grundlagenforschung

Heterosis ist die Bezeichnung für eine überdurchschnittliche Vitalität, die ausschließlich bei mischerbigen Pflanzen und Tieren auftritt. F1-Hybride, die durch Kreuzung von Inzuchtlinien entstehen, zeigen das größt mögliche Maß an Vitalität. Kennzeichnend für diese Vitalität sind unter anderem ein hoher Zuwachs in der Biomasse, eine schnellere Entwicklung sowie eine verbesserte Fruchtbarkeit (Rood *et al.*, 1988; Song und Messing, 2003; Birchler *et al.*, 2003; Semel *et al.*, 2006; Swanson-Wagner *et al.*, 2006) (Abb.1). Bereits 1914 wurde von Shull zur erleichterten Beschreibung des Phänomens und als Kurzform für den Ausdruck „stimulation of heterozygosis“ der Begriff „Heterosis“ geprägt.

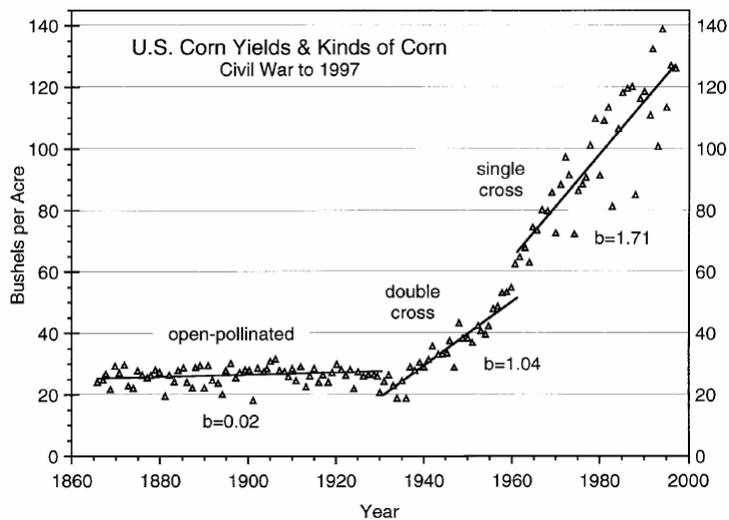


**Abbildung 1: Heterosis in Mais**

Repräsentative Pflanzen der Maisinzuchtlinien 301x301 (UH301) und 005x005 (UH005) und die Nachkommen aus reziproken Kreuzungen (der weibliche Elter wird in der genetischen Mais-Nomenklatur als erstes genannt); UH301 und UH005 sind europäische Maisinzuchtlinien der Zahn- (dent) bzw. Hartmaisformen (flint). Die F1-Nachkommen, die durch Kreuzung dieser Inzuchtlinien entstehen, sind größer und zeigen eine schnellere Entwicklung als beide Elternlinien, wodurch die Hybridvitalität deutlich zu Tage tritt. In Europa finden sich im Konsumanbau in der Regel Kreuzungen zwischen Zahn- und Hartmaisformen ([www.maiskomitee.de](http://www.maiskomitee.de)).

Entdeckt wurde die Hybridvitalität in Mais (*Zea mays subsp. mays* L.) durch Untersuchungen von Shull (1908) und East (1908), die erstmalig das Potential von Heterosis für die Agrarwirtschaft aufzeigten. Bereits 1909 folgten revolutionierende Änderungen im Maiszuchtprogramm (Crow 1998), die zu dem verstärkten Einsatz von Hybriden in der Landwirtschaft führten (Abb. 2).

Durch den Anbau von Hybridpflanzen wird ein höherer Ertrag pro Fläche als für die elterlichen Linien selbst zu erwarten wäre, erzielt (Swanson-Wagner *et al.*, 2006). Auf 95% der Maisanbaufläche der USA wird daher seit mehr als einem halben Jahrhundert Hybridmais angebaut, der auf Grund der Uniformität, der verbesserten Anpassung an Lebensräume und Vegetationszeiten sowie der Robustheit und Resistenz gegen Trockenheit deutliche Vorteile bietet (Crow 1998; Guo *et al.*, 2006). Duvick (1999) stellte fest, dass Heterosis weltweit für zusätzliche 55 Mio. t Körnerertrag jährlich verantwortlich ist, wobei Russell (1974) und Duvick (1977) durch Aussaat von Hybridsaatgut aus verschiedenen Jahrzehnten zeigen konnten, dass mehr als 60% der Ertragssteigerung genetisch bedingt sind und nicht auf verbesserte Anbaumethoden zurückgehen.



**Abbildung 2: Züchterisch optimierter Maisertrag**

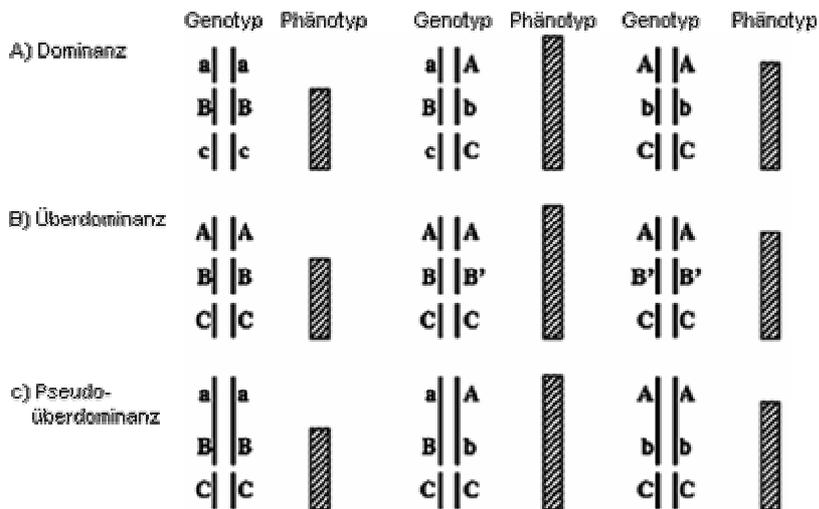
Die Steigerungen im Maisertrag in „bushels per acre“ (36,37l / 4047qm) der letzten 140 Jahre sind für die USA gezeigt. Die Zeiträume, die durch offen bestäubte Landrassen (open-pollinated), Doppelhybride (double cross) und Einfachhybride (single cross) bestimmt waren, sind zusammen mit den Regressionsgraden und den Regressionskoeffizienten (bushel/acre) gegeben. Doppelhybride wurden zu Beginn der Maiszüchtung für den landwirtschaftlichen Anbau erzeugt. Sie entstehen aus einer Kreuzung von zwei Einfachhybriden [(AxB)×(CxD)]. Die züchterische Optimierung von Inzuchtlinien machte es seit 1960 möglich, Einfachhybrid-saatgut, das der kontrollierten Kreuzung von zwei Inzuchtlinien (AxB) entspringt, für die Landwirtschaft zur Verfügung zu stellen. (Crow, 1998)

Obwohl Heterosis extensiv in der Getreideproduktion genutzt wird und eine wirksame Kraft in der Evolution darstellt, ist die genetische Basis von Heterosis trotz intensiver Forschungsarbeit bislang ungeklärt (Birchler *et al.*, 2003).

Es gibt zwei klassische Hypothesen zur genetischen Basis von Heterosis. Die Dominanzhypothese geht auf Davenport (1908), Keeble und Pellew (1910) sowie Bruce (1910) zurück, die den größeren Ertrag der Hybriden der Unterdrückung der nachteiligen rezessiven Allele des einen Eltern durch dominante Allele des anderen Eltern zuschreiben. In einem F1-Hybrid könnten nachteilige Mutationen der Inzuchtlinien daher nicht zum Tragen kommen, wodurch die Filialgeneration beide Eltern übertreffen kann. Sollte Dominanz einzig verantwortlich für Heterosis sein, müsste es möglich sein, Inzuchtlinien ähnlich der F1-Hybride zu erzeugen, in denen alle vorteilhaften Allele vereint sind. Diese Situation ist nie aufgetreten (East, 1936; Swanson-Wagner *et al.*, 2006). Die Überdominanzhypothese (East, 1936; Crow, 1948) besagt dem gegenüber, dass an bestimmten Schlüsselgenorten die heterozygote Variante der Hybride auf Grund von allelischen Interaktionen gegenüber der jeweiligen homozygoten Variante in Inzuchtlinien überlegen ist. Seit Gardner (1963) und Moll *et al.*, (1964) wird auch eine Pseudoüberdominanz, die durch unbemerkte Kopplung von Ertrag steigernden dominanten Allelen mit nachteiligen rezessiven erzeugt wird, diskutiert (Abb.3). Aus jüngerer Zeit stammt die Epistasishypothese, die Heterosis auf die Interaktion vorteilhafter Allele zurückführt, die sich an verschiedenen Orten des Genoms befinden.

Yu *et al.* (1997), Li *et al.* (2001), Luo *et al.* (2001) und Meyer *et al.* (2004) fanden in ihren Untersuchungen Indizien dafür, das Epistasie eine übergeordnete Rolle bei der Entstehung von Heterosis zukommt. In Versuchen von Stuber *et al.* (1992) und Semel *et al.* (2006) deutet

die Identifikation von bestimmten Genorten, die quantitative Merkmale bestimmen („Quantitativ Trait Loci“, QTL) auf Überdominanz hin. Auch Song und Messing (2003) wiesen statt der erwarteten Dominanz Überdominanz nach. Umfangreiche Analysen von Cockerham und Zeng (1996) stehen dem gegenüber im Einklang mit Pseudoüberdominanz. Spargue und Russel (1956), Spargue (1983) und Xiao *et al.* (1994) vertreten die Dominanzhypothese, die durch Ergebnisse von Fu und Dooner (2002) unterstützt wird.



**Abbildung 3: Genetisches Modell für Heterosis**

Dem Diagramm liegt die Hypothese zu Grunde, dass der Phänotyp oder ein Merkmal durch verschiedene gekoppelte oder ungekoppelte Genorte (z.B. a, b und c) kontrolliert wird. A) Dominanzhypothese: Die Inzuchtlinien 1 und 2 tragen nachteilige homozygote Allele (a und c im Elter 1, b in Elter 2). Im F1-Hybrid komplementieren die vorteilhaften Allele (A, B und C) an jedem Genort die unterliegenden Allele a, b, und c, wodurch Heterosis zum Tragen kommt. B) Überdominanzhypothese: Die homozygoten Allele sind am Genort b unterschiedlich in den beiden Eltern [Elter 1: (BB), Elter 2: (B'B')]. Wenn die Allele B und B' im F1-Hybriden zusammenkommen, interagieren sie, so dass Heterosis entsteht. C) Pseudoüberdominanz: Der überlegende Phänotyp in der F1-Generation geht auf kleinere Chromosomenregionen zurück, welche zwei oder mehr Genorte aufweisen, die gekoppelt sind. Die Anwesenheit der vorteilhaften Allele A und B im F1-Hybrid führen auf Grund von Komplementation zu einem verbesserten Phänotyp, obwohl Überdominanz suggeriert wird. (Birchler *et al.*, 2006)

Die Verschiedenheit der Erkenntnisse in Hinblick auf Heterosis deutet an, dass das Phänomen komplexe Ursachen hat. Ein Zusammenspiel verschiedenster Effekte, die Überdominanz, Pseudoüberdominanz, Dominanz und Epistasie mit einschließen, wird daher als Erklärung für Heterosis diskutiert (Stuber *et al.*, 1992; Crow, 1998).

Wenig verstanden sind bislang die molekularen Mechanismen, die mit dem Phänomen Heterosis verknüpft sind (Swanson-Wagner *et al.*, 2006; Yao *et al.*, 2005).

Doebly und Lukens vermuteten 1998, dass die molekulare Basis für die phänotypischen Veränderungen der Hybride in variabler Genomexpression begründet sein könnte. Sun *et al.* detektierten 1999 signifikante Unterschiede in der mRNA-Menge und den Expressionsmustern zwischen Hybriden und den elterlichen Inzuchtlinien in Blättern von Weizenkeimlingen. Die Analysen von Song und Messing (2003) in Mais, die ebenfalls

Expressionsunterschiede aufzeigten, lösten nachfolgend umfangreiche Untersuchungen zur Heterosis assoziierten Genexpression aus.

Aus molekularer Sicht sind zwei extreme Modelle zur Erklärung von Heterosis denkbar: Zum einen ist es vorstellbar, dass in einem Hybrid bei dem Zusammenbringen unterschiedlicher Allele an verschiedenen Genorten eine kombinierte allelische Expression (dem elterlichen Durchschnitt ähnlich: additiv) entsteht. Zum anderen ist es möglich, dass die Kombination von verschiedenen Allelen zu einer Interaktion führt, die in Hybriden eine vom elterlichen Mittel abweichende Genexpression verursacht (Birchler, 2003). Das Transkriptionsniveau kann in diesem Fall dem höchst exprimierenden bzw. geringst exprimierenden Elter ähnlich sein (Dominanz) oder über bzw. unter dem Maß beider Eltern liegen (Über- bzw. Unterdominanz). Eine Ursache dafür könnten Interaktionen zwischen Allelen sein, die regulatorische Netzwerke verändern und auf diese Weise zu einer neuen Art der Genexpression führen (Stupar und Springer, 2006). Zu beachten ist, dass die in der klassischen Genetik bereits benutzten Begriffe „Dominanz“ und „Überdominanz“ unter molekularen Gesichtspunkten wieder verwendet werden, hier jedoch ausschließlich zur Beschreibung von Expressionsmustern dienen.

Eine wachsende Anzahl von Studien sowohl im Pflanzen- als auch im Tierreich zeigt, dass nicht additive Genexpression recht häufig in verschiedenen Hybridsituationen vorkommt (Adams *et al.*, 2003; Hämmerle und Ferrus, 2003; Michalak und Noor, 2003; Song und Messing, 2003; Auger *et al.*, 2005; Gibson *et al.*, 2004; Ranz *et al.*, 2004).

Vuylsteke *et al.* (2005) detektierten bei Expressionsanalysen in *Arabidopsis thaliana* nur 27-37,5% Additivität. Huang *et al.* (2006) konnten bei Untersuchungen in Reis ebenfalls feststellen, dass nur 32% der differentiell exprimierten Gene ein additives Verhalten zeigten. Den Studien, die hauptsächlich nicht additive Genexpression nachgewiesen haben, stehen Forschungsarbeiten gegenüber, die zu einem anderen Ergebnis kamen. Swanson-Wagner *et al.* (2006) konnten alle möglichen Arten der Genexpression (additiv, dominant, überdominant und unterdominant) in einem globalen Vergleich der Expression eines Mais-F1-Hybrids mit dessen elterlichen Linen im Keimlingsstadium nachweisen, wobei jedoch der größte Anteil (78%) der differentiell exprimierten Gene ein additives Expressionsverhalten aufwies. Bei der vergleichenden Untersuchung von Keimlingen, unreifen Kolben und 19 Tage alten Embryonen konnten Stupar und Springer (2006) zeigen, dass 61-81% der differentiellen Gene additiv exprimiert waren. Diese Autoren schlossen aus ihren Ergebnissen, dass additive oder nahezu additive Expressionsmuster in Hybriden überwiegen.

Die regulierenden Mechanismen der differentiellen Transkription zwischen Hybriden und Inzuchtlinien sind bislang kaum erforscht. Yao *et al.* (2005) vermuteten, dass verschiedene regulierende Prozesse bei der Transkription, auf dem posttranskriptionalen Level so wie eine epigenetische Kontrolle z.B. durch DNA-Methylierung, Histonacetylierung und Chromatinremodulierung mit den transkriptionalen Veränderungen in Beziehung stehen könnten. Von Osborn *et al.* (2003) wurde vorgeschlagen, dass veränderte regulatorische Interaktionen z.B. durch differentielle Expression von spezifischen Transkriptionsfaktoren die Basis für Heterosis in Pflanzen sein könnten.

## 1.2 Genregulation und Chromatinstruktur

Eine multizelluläre Entwicklung und Zelldifferenzierung sind die Auswirkungen einer präzisen Choreographie von Genen, deren Transkription sowohl temporär als auch räumlich kontrolliert ist (Reyes, 2006). Viele Arbeiten haben gezeigt, dass jedes Gen auf eine eigene Art und Weise reguliert wird. Das bedeutet, dass eine Vielzahl an Regulationsmechanismen in die Regulation eines Gens eingreifen, deren Kombination für jedes Gen unterschiedlich sein kann.

Ergebnisse von Auger *et al.* (2005) stehen in Bezug auf Heterosis in Einklang mit regulatorischen Interaktionen, die unter Hybridbedingungen neue Effekte auf Zielgene produzieren. Um eine Erklärung für die molekulare Basis von Heterosis zu finden, ist es daher wichtig, die Genexpression im Hybrid- und Inzuchtstatus zu verstehen (Auger *et al.*, 2005). Guo *et al.* vermuteten 2006, dass die erhöhte Leistungsfähigkeit von Hybriden ein Ergebnis einer veränderten Genregulation sein kann, entweder auf einem globalen Niveau oder für eine bestimmte Klasse von Genen. Birchler gab 2001 zu bedenken, dass viele QTLs, für die die molekulare Basis bekannt ist, transkriptionale Faktoren oder Mitglieder der Signaltransduktionskaskaden sind.

Eine Grundlage der Regulation ist die Wechselwirkung von *trans*-aktivierenden Faktoren (Transkriptionsfaktoren) mit spezifischen Bindestellen im Promotorbereich oder Enhancerregionen eines Gens, die *cis* lokalisiert sind. Wittkopp *et al.* konnten 2004 zeigen, dass quantitative Unterschiede in der Genexpression das Ergebnis von *cis*- oder *trans*-Variationen in der Genregulation sind. Aus den Versuchen von Guo *et al.* (2004) und Schadt *et al.* (2003) kann abgeleitet werden, dass in Mais ein großer Anteil der intraspezifischen Variationen des Genexpressionsniveaus *cis*-regulatorischen Variationen zugeschrieben werden können (Stupar und Springer, 2006). Variationen in der *cis*-Regulation haben ihre Ursache in Veränderungen der basalen Promoterregion oder entfernt liegenden Enhancerbereichen des differentiell exprimierten Gens. Durch diese Veränderungen sind die Transkriptionsinitiation, die Transkriptionsrate und/oder die Transkriptstabilität in allelspezifischer Weise betroffen (Wittkopp, 2005). Variierende *trans*-Regulation wird durch Veränderungen an nicht gekoppelten Genorten hervorgerufen (Stupar und Springer, 2006), deren Genprodukte (Transkriptionsfaktoren, Co-Faktoren, Signaltransduktionsproteine) die Expression anderer Gene regulieren (Wittkopp, 2005).

Die regulierenden Faktoren sind Empfänger von Signalen, die oft von der Zelloberfläche oder dem Zytoplasma über mehrere Stationen einer Signaltransduktionskette in den Zellkern gelangen. Ein wichtiges Merkmal der Signaltransduktion besteht darin, dass Rezeptoren nur die Startpunkte eines komplexen Netzwerkes sind, in dem „Cross talk“, „Feedback-Schleifen“, Gabelungspunkte und Signalkomplexe mit verschiedenen Komponenten aufeinander abgestimmt sein müssen, um die Transkription von Zielgenen im Zellkern zu veranlassen (Diévert und Clark, 2004).

Guo schlussfolgerte 2001 aus ihren Ergebnissen, dass epigenetische Mechanismen in Hinblick auf Heterosis an einer globalen Genregulation beteiligt sein können. Genetische und reversgenetische Analysen haben kürzlich in *Arabidopsis* gezeigt, dass die Remodulierung

von Chromatin durch Chromatinmodifizierer in Prozessen wie Pflanzenwachstum und Pflanzenentwicklung und einer Vielzahl anderer biologischer Prozesse entscheidend ist (Guyomarc'h *et al.*, 2005; Reyes *et al.*, 2002; Wagner, 2003). Durch Chromatinmodifizierung wird die Genregulation kontrolliert und epigenetische Kennzeichen, die vererbt werden können, etabliert (Reyes, 2006). Chromatinmodifizierer können in drei funktionelle Klassen unterteilt werden: Histonchaperone, Histonmodifikationsenzyme und ATP abhängige Chromatin remodulierende Enzyme. Histonchaperone verhindern die fehlerhafte Faltung und Aggregation von Histonen. Histon modifizierende Enzyme können kleine chemische Molekülgruppen (Acetyl, Phosphat, Methyl) oder Proteine an aminoterminalen Abschnitten der Histone anhängen. Sie verändern dadurch den so genannten „Histon code“, welcher Informationen über den transkriptionalen Status enthält und als epigenetische Kennzeichnung vererbt werden kann (Reyes, 2006). Chromatinacetylierung veranlasst beispielsweise transkriptionale Aktivität, wohin gegen Deacetylierung von Chromatin mit Genstilllegung einhergeht. Da zusätzliche Chromatinmodifikationen synergetische oder antagonistische Effekte haben können, spielt der Gesamtzustand für die transkriptionale Aktivität eine entscheidende Rolle (Denu, 2003). ATP abhängige Chromatin remodulierende Enzyme können die Interaktion zwischen DNA und den Histonoktameren verändern. Diese Änderungen resultieren in einer Destabilisierung der Nukleosomenstruktur, so dass für generelle und spezifische Transkriptionsfaktoren ebenso wie für DNA-Replikation, Rekombination und Reparaturfaktoren der Zugang zur DNA frei ist (Reyes, 2006).

Eine weitere epigenetische Kennzeichnung, die ebenso wie der „Histon code“ stabil und vererbbar ist, wird durch DNA-Methylierung erreicht, die eine Reprimierung der Genexpression zur Folge hat (Bird und Wolffe, 1999; Chaudhury und Berger, 2001). Methylierung kann direkt durch die Blockierung oder reduzierte Bindung von Transkriptionsfaktoren an der Zielsequenz (Prendergast und Ziff, 1991) oder indirekt durch das Induzieren einer kondensierteren Chromatinstruktur (Kass *et al.*, 1997) Einfluss auf die Genaktivität nehmen. Im letzteren Fall wird die Repression durch Proteinkomplexe vermittelt, die speziell an methylierte Reste binden, worauf dann Chromatin remodulierende Faktoren rekrutiert werden (Jones *et al.*, 1998; Nan *et al.*, 1998; Reyes, 2006).

In Pflanzen sind transponierbare Elemente im Vergleich zu anderen Genen stark methyliert. Dies deutet darauf hin, dass die durch DNA-Methylierung induzierte Stilllegung ein Hilfsmittel gegen Transposition ist (Martienssen und Colot, 2001; Allshire, 2002; Tran *et al.*, 2005). DNA-Methylierung kann aber auch entwicklungspezifische Regulatoren in gewebespezifischer Art und Weise stilllegen. Ferner begleitet DNA-Methylierung das so genannte Imprinting von Genen, das darauf beruht, dass eine allelspezifische Stilllegung dem elterlichen Ursprung entsprechend erfolgt (Adams *et al.*, 2000; Reik und Walter, 2001; Berger, 2004; Gehring *et al.*, 2004).

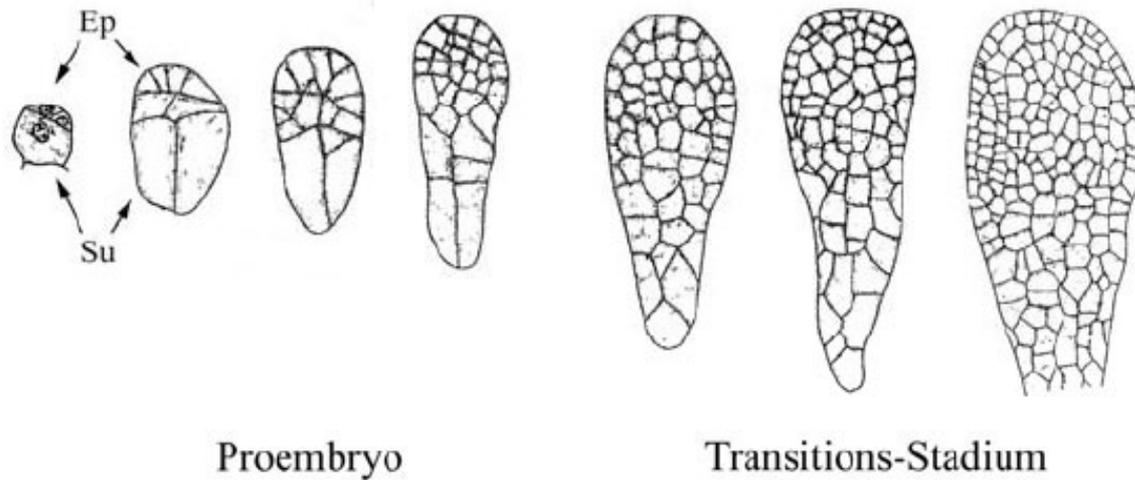
### **1.3 Pflanzliche Embryogenese**

Kornqualität und Kornertrag, welche die Hauptziele der Pflanzenzüchter sind, hängen in hohem Maße von der Kornentwicklung ab (Ben *et al.*, 2005). Tatsächlich ist in höheren Pflanzen die Embryogenese ein Schlüsselschritt der Entwicklung: Es vollzieht sich hier der Übergang vom befruchteten Ei hin zum multizellulären Organismus (Laux und Jürgens, 1997), der Embryo eignet sich einen morphologisch korrekten Grundbauplan an und Speicherreserven werden akkumuliert (Ben *et al.*, 2005).

Der pflanzliche Lebenszyklus beginnt in Angiospermen mit der doppelten Befruchtung, welche die Embryogenese einleitet (Okamoto *et al.*, 2005). Durch die Verschmelzung der Gameten Eizelle und Spermazelle entsteht eine diploide Zygote, aus der sich der Embryo entwickelt. Aus der Fusion einer zweiten Spermazelle mit der Zentralzelle, die zwei haploide Zellkerne enthält, resultiert das triploide Endosperm. (Russell, 1992; Goldberg *et al.*, 1994; Drews *et al.*, 1998; Adams *et al.*, 2000). Um experimentellen Zugang zu den frühen Ereignissen der Embryogenese zu erhalten, wurden Mikromanipulations-, Fusions- und Kulturtechniken entwickelt (Kranz *et al.*, 1991; Faure *et al.*, 1994; Scholten und Kranz, 2001). Diese Techniken ermöglichen detaillierte Untersuchungen der frühen Embryo- und Endospermentwicklung (Kranz und Kumlehn, 1999).

Durch die Befruchtung der zwei weiblichen Gameten, Eizelle und Zentralzelle, werden unterschiedliche Entwicklungsprogramme eingeleitet (Russel, 1993), die den Aufbau verschiedenster Gewebe im Samen veranlassen.

Die erste Zellteilung der Zygote geschieht ca. 32 h nach der Bestäubung und verläuft in Mais asymmetrisch (Kranz und Dresselhaus, 1996). Es entsteht ein zweizelliger Proembryo, der aus einer kleinen plasmareichen Apikalzelle und einer großen vakuolisierten Basalzelle aufgebaut ist (Okamoto *et al.*, 2005; Mansfield und Briarty, 1990; Lindsey und Topping, 1993). Aus der Apikalzelle gehen die zytoplasmareichen Zellen des eigentlichen Embryos durch ungerichtete Zellteilung hervor (Randolph, 1936; Poethig *et al.*, 1986). Ebenfalls auf der Basis von ungerichteten Zellteilungen entstehen aus der Basalzelle die stärker vakuolisierten Zellen des Suspensor (Randolph, 1936; van Lammerern 1986). Der eigentliche Embryo und der Suspensor bilden zusammen den Proembryo, der im Zuge der Entwicklung in das ca. zwei Tage andauernde Transitionsstadium übergeht, das der Vorbereitung zur Keimblattbildung dient (Randolph, 1936; Abbe und Stein 1954) (Abb. 4). Der Suspensor ist eine transiente Struktur des Embryos, die eine physikalische Verbindung zwischen Embryo und mütterlichem Gewebe bildet, Nährstoff, Hormone und Wachstumsfaktoren an den Embryo übermittelt und bereits in der frühen Entwicklung zu Grunde geht (Yeung und Meinke, 1993; Ben *et al.*, 2005).



**Abbildung 4: Frühe embryonale Entwicklung in *Zea mays* (nach Randolph, 1936)**

Gezeigt ist die phänotypische Entwicklung vom zweizelligen Proembryo bis zum Embryo des Transitionsstadiums. Ep: der eigentliche Embryo, Su: Suspensor

Heterozygote Nachkommen werden durch die gemeinsame Aktivität der elterlichen Genome geprägt (Guo *et al.*, 2004). Die Aktivierung des väterlichen Genoms kennzeichnet den Übergang von der mütterlichen zur embryonalen Kontrolle der Entwicklung und den Beginn des aus sich selbst heraus bestimmten Entwicklungsprogramms (Grimanelli *et al.*, 2005), das für die Ausprägung von Heterosis grundlegend ist.

In Tieren ist die frühe embryonale Entwicklung größtenteils abhängig von mütterlichen Transkripten, die während der Gametogenese synthetisiert werden (Nothias *et al.*, 1996). Wegen der Detektion ausschließlich maternaler Genprodukte bis zum Midglobularstadium der Embryonen aus *Arabidopsis* vermuteten Vielle-Calzada *et al.* (2000), dass dem mütterlichen Genom auch bei Pflanzen eine zentrale Rolle in der Regulation der frühen Embryogenese zukommt und der größte Teil, wenn nicht sogar das gesamte väterliche Genom zunächst stillgelegt wird. 2001 schlussfolgerten Baroux *et al.* aus der Expression von Transgenen, dass einige väterlich vererbte Gene nach der Befruchtung schon früh auf einem basalen Niveau exprimiert werden. Die väterliche Expression steige dann insgesamt graduell an, um im Midglobularstadium das mütterliche Niveau zu erreichen, wobei vermutlich ein genereller Mechanismus die Unterrepräsentierung von väterlichen Transkripten bedingt (Baroux *et al.*, 2001). Scholten *et al.* konnten 2002 zeigen, dass neu transkribierte *gfp*-mRNA 4 Stunden nach der *in vitro* Befruchtung einer Mais Wildtyp-Eizelle mit einer *gfp*-transgenen Spermazelle detektierbar war. Auf Grund dieses Ergebnisses vertraten Scholten *et al.* (2002) die Meinung, dass globale Mechanismen zur Stilllegung des gesamten väterlichen Genoms in Mais nicht existieren und ein fast sofortiger väterlicher Beitrag zur Zygoten- und frühen Endospermentwicklung denkbar ist. Grimanelli *et al.* konnten allerdings 2005 für 16 früh exprimierte, endogene Gene in den ersten drei Tage nach der Befruchtung keine paternalen Transkripte in Mais detektieren. Sie schlussfolgerten aus ihren Ergebnissen, dass sich der Übergang von der maternalen zur embryonalen Kontrolle bis zum dritten Tag nach der Befruchtung nicht ereignet hat und in Mais die ersten Teilungen des Proembryos maternal kontrolliert ablaufen.

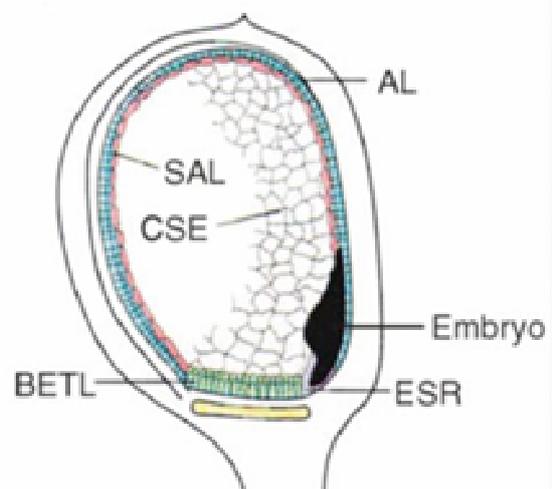
Das triploide Endosperm unterscheidet sich nicht nur grundlegend vom Embryo wegen der genomischen Verhältnisse, die sich durch das Vorliegen zweier maternaler Genome und eines paternalen Genoms (2m:1p) ergeben, sondern auch durch die Entwicklung (Kinoshita *et al.*, 1999). In Mais kann die Endospermentwicklung in verschiedene Stadien unterteilt werden (Clore *et al.*, 1996; Kranz *et al.*, 1998; Olsen, 2004).

Während des ersten Stadiums, das den Zeitraum von der Befruchtung bis 3 Tage nach der Bestäubung abdeckt, entsteht ausgehend vom initialen Endospermkern ein Synzytium durch schnelle Kernteilungen, die ohne Zellwandbildung verlaufen. Die Zellularisierung ereignet sich während des zweiten Stadiums, ca. 3 bis 5 Tage nach der Bestäubung („days after Polination“, dap), durch Bildung von Zellwänden um die einzelnen Zellkerne. Das dritte Stadium ist charakterisiert durch mitotische Teilungen, die in den zentral gelegenen Zellbereichen bis 12 dap und im peripheren Gewebe bis 20 – 25 dap ablaufen, und der Differenzierung der Endospermzellen. Das differenzierte Endosperm umfasst vier hauptsächliche Zelltypen: stärkehaltiges Endosperm, Aleuron, Transferzellen und Zellen der Embryo umgebende Region (Olsen, 2001; 2004) (Abb. 5). Diese Zelltypen grenzen sich durch einen unterschiedlichen Zellaufbau, einer für den Zelltyp spezifischen Genexpression und Funktion deutlich von einander ab (Olsen, 2001; 2004).

Das Endosperm hat eine zentrale Bedeutung für die Embryogenese, da es diverse Aufgaben übernimmt (Laux und Jürgens, 1997), die auch mit der Ausprägung von Heterosis in Verbindung stehen können. Dem Endosperm obliegt die Ernährung des Embryos (Brink und Cooper, 1947; Lopes und Larkins, 1993), wobei es den Strom von maternalen Nährstoffen kontrolliert (Jullien *et al.*, 2006). In Getreide ist das Endosperm der hauptsächliche Ort für die Speicherung von Reserven und stellt Hormone zur Verfügung, um das embryonale Wachstum zu regulieren (Hong *et al.*, 1996; Olsen, 1998). Das Endosperm übernimmt ferner die Aufrechterhaltung eines hohen osmotischen Potentials um den Embryo herum und die Funktion als mechanische Stütze während des frühen embryonalen Wachstums. Des Weiteren speichert es Reserven und Hormone für die Samenkeimung (Lopes und Larkins, 1993) und reguliert die Fruchtentwicklung (Ohad *et al.*, 1996).

**Abbildung 5: Korn von *Zea mays*, 15 dap**

Die verschiedenen Gewebe des Endosperms und die Position des Embryos in einem 15 dap Maiskorn sind gezeigt. ESR: Embryo umgebende Region, BETL: Basale Transferzellen des Endosperms, SAL: Subaleuron-Zellschicht, CSE: Zentral gelegenes, stärkehaltiges Endosperm, AL: Aleuronzellen, (Chaudhury *et al.*, 2001)



## 1.4 Ziele der Arbeit

Heterosis besitzt wegen des Potentials zur überdurchschnittlichen Ertragssteigerung eine große Bedeutung in der Landwirtschaft. Obwohl die Züchtung durch Heterosis seit 100 Jahren große Erfolge vorweist, ist trotz intensiver Forschungsarbeit nur wenig über die Grundlage von Heterosis bekannt. Die Identifikation und Charakterisierung von Heterosis assoziierten Genen und Expressionsmustern ermöglichen den Einstieg zur Erforschung von regulatorischen Netzwerken und Mechanismen, die für die Ausprägung von Heterosis von Bedeutung sind.

Die Embryogenese ist das zentrale Ereignis im Lebenszyklus der Pflanze, da Anlagen für alle weiteren Lebensabschnitte im Zuge der Entwicklung gelegt werden. Genetische Prozesse der frühen Embryogenese scheinen bezüglich Heterosis von besonderer Bedeutung zu sein, da im Zuge des aufeinander Abstimmens der elterlichen Genome und der Etablierung einer kombinierten Genexpression die zukünftige Leistungsfähigkeit des Sporophyten definiert werden könnte.

Das Ziel dieser Arbeit ist, Heterosis in der Kornentwicklung von Mais zu charakterisieren und assoziierte Genexpression in der frühen Embryo- und Endospermentwicklung sowie deren Regulation zu untersuchen.

Im Rahmen dieses Vorhabens sollten Kreuzungen zwischen unterschiedlichen Inzuchtlinien durchgeführt werden, um Hybrid- und Inzuchtnachkommen zu erzeugen. Die hervorgehenden homo- und heterozygoten Embryonen sowie Endospermgewebe sollten zu verschiedenen Zeitpunkten der Entwicklung isoliert und einer vergleichenden phänotypischen Charakterisierung unterzogen werden. Mit Hilfe eines kombinierten Ansatzes aus suppressiver subtraktiver Hybridisierung, Microarrayanalysen und quantitativer RT-PCR sollte die Heterosis assoziierte Genexpression sechs Tage nach der Bestäubung analysiert und charakterisiert werden. Die für Heterosis essentielle paternale Genomaktivierung und Genregulationsmechanismen in der frühen Embryonalentwicklung sollten durch allelspezifische Expressionsanalysen untersucht werden.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Material**

#### **2.1.1 Pflanzen**

Für das Schwerpunktprogramm 1149 „Heterosis in Pflanzen“ wurden vier QTL kartierte Maisinzuchtlinien von Prof. Dr. A. Melchinger (Universität Hohenheim, D) zur Verfügung gestellt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei der vier Inzuchtlinien verwendet: die Hartmaislinie UH005 [Nummer der nationalen Pflanzendatenbank: M9379, flint] sowie die Zahnmaislinien UH301 [M8652, Iodent] und UH250 [M9005, Iowa Stiff Stalk Synthetic]. Die Linien zeichnen sich in Kreuzungsversuchen durch ein hohes Maß an Heterosis aus, wobei die Hybridvitalität in Kreuzungen zwischen der Hartmaislinie und einer Zahnmaislinien (interpool Kreuzung) in den verschiedenen Stadien nach der Keimung stärker zu Tage tritt als bei Kreuzungen der Zahnmaislinien (intrapool Kreuzung). Die genetische Distanz zwischen den Linien beträgt: UH005-UH301: 0,772, UH005-UH250: 0,795 und UH301-UH250: 0,714 (Hoecker *et al.*, 2005).

#### **2.1.2 Chemikalien und Enzyme**

Die verwendeten Chemikalien wurden von folgenden Firmen bezogen: Applichem (Darmstadt, D), Bio-Rad (München, D), Brand (Wertheim/Main, D), Duchefa (Haarlem, NL), Fluka (Buchs, CH), Merk (Darmstadt, D), Roche Molecular Biochemicals (Mannheim, D), Roth (Karlsruhe, D), Serva (Heidelberg, D) und Sigma-Aldrich (Taufkirchen, D). Sie entsprachen dem Reinheitsgrad „zur Analyse“ oder „reinst“. Die Herstellung von Lösungen und Medien erfolgte mit deionisiertem Wasser der Qualität „*aqua bidest.*“ (Milli-Q Water System, Millipore, Bedford, MA, USA). Bei Bedarf wurden die Lösungen und Medien autoklaviert (20 min, 120°C,  $2 \times 10^5$  Pa) oder sterilfiltriert (Millex GP-Filter, Porendurchmesser 0,22 µm, Millipore, Bedford, MA, USA). Allgemein gebräuchliche molekularbiologische Lösungen wurden nach Sambrook *et al.* (1989) hergestellt.

Die eingesetzten Enzyme und ihre Puffer wurden bei den Firmen Biosciences Clontech (Erembodegem, Belgien), Invitrogen (Karlsruhe, D), Fermentas LIFE SCIENCES (St. Leon-Rot, D), New England BioLabs (Frankfurt a. M., D) und Roche Molecular Biochemicals (Mannheim, D) gekauft.

#### **2.1.3 Oligonukleotide**

Die Oligonukleotide wurden von den Firmen Biomers.net (Ulm, D), Invitrogen (Karlsruhe, D) und vbc-biotech ([www.vbc-biotech.com](http://www.vbc-biotech.com), Vienna, Österreich) synthetisiert.

qRT-PCR Analysen\*

SteM/CB12_II.for SteM/CB12_II.rev	AGGGCAATTCATGTAAGCACTTCAA AGGCTCGGGTTTTCTTCTCAGG	Ste.M/FC11.fw Ste.M/FC11.rv	CATTCGCGTTCATGCTTATACTGTTGC CTGTGGAGAAGGTCTTGGCTGGAG
SteM/qOC8.for SteM/qOC8.rev	CAACAAGGCCACAACCCACAA GGATATCACTTCAATGCCAGACTACAAA	Ste.M/HC11.fw Ste.M/HC11.rv	CCTATGACCAGCATGCTGAAAGAAAAG TTAAACGTGTGGGATCATGAGAAGGTG
SteM/qFF2.for SteM/qFF2.rev	AGCTACAGTGGCAGGAAGTTCATACC ATAATCCAGCAGCCATCAAGAAGT	Ste.M/HE2.fw Ste.M/HE2.rv	AATATGCAGAGCTTCCGGGTCGT GCAGCAGAGCATTGGCCTTACA
SteM/qJE4.for SteM/qJE4.rev	AGCCTCCTCCACCTTCAACC TGGGGCAGGTGAGAATGTCAT	Ste.M/LC1.fw Ste.M/LC1.rv	CATGAGGCACCCTGCAGACTACC AGTTCCTGGCCGAATCACTGTATTATT
SteM/qJC1.for SteM/qJC1.rev	TTGTTGCTTAGCCTCGTAGTATTGTCG GATCGGCAGAAATTGAAGGAGGAC	Ste.M/OA5.fw Ste.M/OA5.rv	CATCGCTCAGTGCATATTCCTTACCATT CACCCCTTGCCTTGACCTCTACTCC
SteM/qS_CC622.for SteM/qS_CC622.rev	TGCCGCAACATTATCATCCAG GTGCCGATAACAGTCCCTCTCAT	Ste.M/QF8.fw Ste.M/QF8.rv	CCCTGTGATCTTGATATTTTTGCTGGTT ACTGGTTGTTGGTGGGTTTTCTGATTC
SteM/qS_CC447.for SteM/qS_CC447.rev	GCATACTCCTGGTCATCGTTGTGCG GGCAGCCTTCTCCCTCTCCAT	Ste.M/Reina.fw Ste.M/Reina.rv	GCTTGCTCCCTCGCCCTGTTG CCCGCCATTGTTGTGCCCTTCT
SteM/qMA7.for SteM/qMA7.rev	CAGGTGCCAGTCTCGGATGTT GCGATGAAGAATTGAGTATGCTGAC	Ste.M/sdg130.fw Ste.M/sdg130.rv	AGCAATGGCAGCACTTACAGAGGATAGA AAGGGGCAAGAACAAGCAGATAAATCC
SteM/qFF10.for SteM/qFF10.rev	GAAGGAGGCATTGATCATACTGGTG GATGACTGTTCTTTGCTTGATGATGATT	Ste.M/set129.fw Ste.M/set129.rv	GCGAGTGCCGGGTGCTGCTGTT AGATTGCCTCGCCTCGTGGTCA
qEC1for_SteMeyer qEC1rev_SteMeyer	GCCGTGCTCCCAGAACAACATA GGTCCGGGTGCTGTGTTTTCTGATTA	SteM/qTC5.for SteM/qTC5.rev	CTCCCGCCTCTGTCTTCTGC ATACACCTGCTGCTGCTGCTAAACAC
qEH2for_SteMeyer qEH2rev_SteMeyer	AACCAAGCAAACGAGCCACAAAA TTCAGCTTCCAGTCTCGCCTCAG	Aktin ex2.for Aktin ex2.rev	TCCTGACACTGAAGTACCCGATTGA CGTTGTAGAAGGTGTGATGCCAGTT
qCH4for_SteMeyer qCH4rev_SteMeyer	GGAAGTGAAGCATAAGCACCAC TCAGTTACAAGTTCATCTCTACATA	Ste.M/BF4.fw Ste.M/BF4.rv	GCGCCTTGCTACTGACTACATTGA GCCAACATACCTCACTTCCCTTCT
qFF8for_SteMeyer qFF8rev_SteMeyer	TGCGTCTTCACTATTTTCTGC GAGCTGGTCTGTTGGGTTCTCT	Ste.M/IC9.fw Ste.M/IC9.rv	GTGTCGCTTGTGGGGCTTCTT TTAGCCGCAGCATTCTCCTTTTTCT
qLB7for_SteMeyer qLB7rev_SteMeyer	TGGCCCGTGTCTTCAACAACCT TACGGCTAACCATCATCAACAACCTG	Ste.M/IA5.fw Ste.M/IA5.rv	TCAGGCGACTGTAAAGGAAAAATC AGCGGCAAACCTGTTACAAATCTGAG
SteMeyer/qGD8.for SteMeyer/qGD8.rev	CACCACCTTGCCATGCCTTGAC TCTTGCTGATTCTGGGACGATAAAC	Ste.M/GF6.fw Ste.M/GF6.rv	CCGCTTGCTGGACTTCTTCTC TTTTCGCTCCCAATGCCTCAA
SteMeyer/qGC10.for SteMeyer/qGC10.rev	GCTCCTGCAGATCGAAAGTGTAGTTG AAAGTTGCTGAATATGGAATGCGTAGAG	Ste.M/GG8.fw Ste.M/GG8.rv	GCTTACCCCAACTCATCGCAACATA CCTCCGGTCTTCTCGTCAACA
SteMeyer/qBA3.for SteMeyer/qBA3.rev	TGGAGGGCATTATACGATCAAACCT TAAAATGCACCTAGGGAATCACAAGA	Ste.M/CG5.fw Ste.M/CG5.rv	AACCCTGTGCCTCCCTATTTACC AAGTTTTAGGCAAGGATCATTACAGG
S.Meyer/qSA11.for S.Meyer/qSA11.rev	CCCGTCACTATTGTTGGTGTGC AGTCCTCGCATCTGGTCTGTCTT	Ste.M/DB4.fw Ste.M/DB4.rv	CTTCATGTTGTTCCACGTTTTCTGT CCATAACTGACCCACCCTTAATCTT
S.Meyer/qJD10.for S.Meyer/qJD10.rev	ATAGGCGTCCCATCGGCATTACAGT TTTTGCAGGAGGCTACAGTCTTCTT	Ste.M/CA1.fw Ste.M/CA1.rv	GGTGAAGGTGATTTCTCATAACTGGA AGCTACTGGATCTGGAAGCACTACAC
Meyer/qTO97.for Meyer/qTO97.rev	GGAAACCGCCAGCAGTACCAG GTCATCGTCGGCAACCCCTTCA	Ste.M/BH11.fw Ste.M/BH11.rv	TTGCCGATATCTTCTCCTCTCTCT ACGCCATTGACATCTTCCACGAC
Ste.M/IE11.fw Ste.M/IE11.rv	;GAGATGTTCCCGAGTATGTGGTC AGCTCGGCAGTGTGATCTATGTCTT		
S.Meyer/qKG9.for S.Meyer/qKG9.rev	GCACCCAGGCTTACAATCC ACCCAGGCCGCTCCAGTT		
Ste.M/TF6.fw Ste.M/TF6.rv	CCAAAGGAACGCATCATCAAAGA TTCATTACACCATCAGGGACATC		
Ste.M/BA7.fw Ste.M/BA7.rv	ATGAGCGGTTCCCTTGATGATAATGT TCCAAAGGGTCCAGTAGAGAAGTAGTA		
Ste.M/CG8.fw Ste.M/CG8.rv	GGACAAAATGGGCGCTCTATGCTA TTGTTGTGAGGAAAAATGGGACGAT		
Ste.M/DH2.fw Ste.M/DH2.rv	GGGGGTGATAACCTCAAACAAAA AAGAGGATGACGGCTCGATGATTA		
Ste.M/FB10.fw Ste.M/FB10.rv	CCTGATTGATTGCGAACGAAAA ATGAAAATGGGCGGTGGAG		

Identifikation der polymorphen Genorte\*

EH038217.for	GGACCGCACTAGCAACTTTTTCTTCAT
EH038217.rev	GCTTTGCCTGGCTTTTCATAACC
EH038214.for	AGGCCAACGGGAACATAAAATAAAA
EH038214.rev	ACAAGGAAATAAGAAACAAAAGGCAAAACA
EH038205.for	GGCCTTGTTGACCTTGAGAAATGAA
EH038205.rev	CCAAACCCACACGGAAAGTAGGAT
EH038211.for	ATCATCAGGCTTCTAATTAATCAGGTG
EH038211.rev	TGTTTCTTATATTCGGGCTGGTGTTTTT
EH038210.for	TCCATTATCATCGACCAACATTACA
EH038210.rev	CAGGCGGATGGGTGAAATA
DW475554.for	TTCAGGCAAGCAAAGAGGA
DW475554.rev	AAAAATATTGGCCGGATCAGAAG
DW475393.for	CCTCGGGGGCATACTCCTGGTCATC
DW475393.rev	CATTGCTGCCGGCTGTCAAGA
EH038213.for	AGATTCGCGCTCAATAAG
EH038221.for	AGGAAGGAGGCATTGATCATACTG
EH038221.rev	CAACGGCAACAATAATCCACCAA
EH038219.for	GCCGTGCTCCAGAACAACT
EH038219.rev	ACCATTTCGTGACCAGCTAAGAT
EH038220.for	AATACAATCCCGGTGACTTCTGAG
EH038220.rev	ATTGCCATTTCCTTTTTGTCTTCT
EH038218.for	CAAGTTCCCCATCTCTACAATAAG
EH038218.rev	AGGCCCTAAACAGTACAAGACA
EH038206.for	GGGAAAGACAGAGGGAGTGCT
EH038206.rev	CAAGGCGCGGAGGAAGATG
EH038212.for	CTTTCGGAGGTAATAACGCAGAC
EH038212.rev	TACGGCTAACCATCATCAACAACC
EH038208.for	GAAGCGACCAGGCCACAGATACATCC
EH038208.rev	AGAGATTTACCAGCAGGCTTAGCAC
EH038207.for	CACCGCAGTCAAGCTTGTCCAGATA
EH038207.rev	CCCACCAGTGACAAACGTTAAATGAAA
EH038216.for	AGGCAAGCAAAGGAAAAGCATAAC
EH038216.rev	ACCTAGGGAATCACAAGAAGTCAAGA
EH038215.for	GGGAACCCGTCATCATTGT
EH038215.rev	TGTTCTCATCCCCTGTTCC
EH038209.for	GTGTGCCGCTTGCTGGGAATAA
EH038209.rev	AATGGGATGTGTTGGCGGAGTA
AB194864.for	GAGCCAAACGGAGGGAGGGACAAC
AB194864.rev	GCGGGAAGGATGCTGGTGGTG

cDNA-Synthese\*

SMART II A Oligonukleotid	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT
3' SMART CDS Primer II A	AAGCAGTGTATCAACGCAGAGTACT
5' PCR Primer II A	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT

Sequenzierung von Inserts in pGEM®-T Easy\*

SP6QL	GTTGGGAGCTCTCCCATAT
T7QL	CGACTCACTATAGGGCGAAT

Amplifikation der Microarraykontrollen\*

uidA.fw	TGAATTCGGGCAGGCCAGCGTATCGTG
uidA.rv	ATGGATCCGTCGCCGCTAGTGCCTTGTCCAGTT
Ö-R.fw	TGAATTCGGCTCCGCAATGCTACGAAGTG
Ö-R.rv	ATGGATCCGGAGCGCCAGACGAGACCAATCAT
gfp.fw	TGAATTCATGGGCAAGGGCGAG
gfp.rv	ATGGATCCTTTCAGTCTCGATGCG
DsRed1.fw	TGAATTCATGGTGCGCTCCTCC
DsRed1.rv	ATGGATCCTACAGGAAGAGGTGG

Überprüfung der Subtraktionseffizienz\*

Ubiquitin.fw	CAGGGGTGGCATGCAGATTTTTG
Ubiquitin.rv	CACCAGACGACGCAGGCACATC
Gapdh.fw	ACTGCCTTGCTCCCTTGCTAA
Gapdh.rv	GGCCCCCTTCTCGATTCTGAC

TF6 Expression in verschiedenen Geweben\*

TF6.fw	CCAAAGGAACGCATCATCAAAGA
TF6.rv	TTCATTACACCATCAGGGACATC

\* Die Sequenz der Oligonukleotide ist in 5'-3' Richtung angegeben.

#### **2.1.4 Bakterien und Plasmide**

Zur Erstellung der subtrahierten cDNA-Banken wurde der Vektor des pGEM<sup>®</sup>-T Easy Systems (Promega, Mannheim, D) genutzt und in *Escherichia coli* Bakterien des Stammes XL1-Blue (BD Biosciences, Heidelberg, D) transformiert. Die Transformation erfolgte nach Inoue *et al.* (1990). Die Selektion transformierter Stämme erfolgte entsprechend dem Selektionsmarker  $\beta$ -Laktamase mit 100 $\mu$ g/ml Ampicillin.

#### **2.1.5 Größenstandards**

Die Größenbestimmung von DNA-Fragmenten in Agarosegelen erfolgte mit dem  $\lambda$ -DNA/*Eco*471-Marker (Fermentas LIFE SCIENCES, St. Leon-Rot, D), der GeneRuler<sup>™</sup> 50bp DNA-Leiter (Fermentas LIFE SCIENCES, St. Leon-Rot, D) und dem 1kb-Marker (Gibco BRL, Karlsruhe, D).

#### **2.1.6 Software zur Sequenzanalyse und Datenbanken**

Die Bearbeitung von DNA-Sequenzen erfolgte mit dem Softwarepaket „DNASTAR Lasergene Vers. 4.00, 1997“ (DNASTAR Inc., USA). Die Archivierung der DNA-Sequenzen, die BlastX und BlastN Datenbankrecherchen, bei der die DNA-Sequenzen mit den aktuellsten Versionen der Datenbanken GenBank, EMBL, DDBJ, Swissprot und PDB verglichen wurden, und die Clusteranalysen wurden mit der frei zugänglichen Software „SeqTools“ (Version 8.3.031, [www.seqtools.dk](http://www.seqtools.dk)) vorgenommen. Für Sequenzalignments wurde das im Internet zur Verfügung gestellte Multialin interface (<http://bioinfo.genopole-toulouse.prd.fr/multalin/multalin.html>) vorwiegend genutzt.

### **2.2 Methoden**

#### **2.2.1 Anzucht und Kreuzung von *Zea mays***

Die Maisinzuchtlinien wurden im Gewächshaus bei 16 Stunden Licht und 8 Stunden Dunkelheit unter Standardbedingungen in Töpfen angezogen. Die Lichtstärke betrug im Zeitraum von Februar bis April 250 – 380 kluxh/d, von Mai bis August 400-600 kluxh/d und von September bis November 250-300 kluxh/d. Die Bewässerung erfolgte automatisch. Das Ausgangssaatgut wurde in der Aufzuchtstation der Universität Hohenheim in der Nähe von Eckersweile (Deutschland) erzeugt und in Hamburg für das Forschungsvorhaben vermehrt. Die Aussaat für Kreuzungsversuche fand im Zeitraum von Januar bis September in den Jahren 2004 und 2005 so statt, dass ein ständiger Gewächshausbestand von ca. 170 Pflanzen vorgehalten wurde. Weibliche Blüten wurden vor dem erscheinen der Nabenfäden abgedeckt, um gezielte Kreuzungen durchführen zu können. Kreuzungen wurden manuell zwischen 10 und 12 Uhr vorgenommen. Um Inzuchtlinien mit den reziproken Hybridgenotypen vergleichen zu können, wurden Selbstungen und Kreuzbestäubungen am selben Tag

gemeinsam durchgeführt. Die zu vergleichenden Genotypen unterlagen daher generell den identischen Ausgangs- und abiotischen Wachstumsbedingungen.

### 2.2.2 Isolation von Pflanzengewebe und Längenmessung

Die Zygotenisolierung erfolgte im Zeitraum von 22-26 Stunden nach der Bestäubung mittels Mikrodissektion wie durch Kranz *et al.* (1991) und Kranz und Kumlehn (1999) beschrieben. Drei *dap* Embryonen konnten auf gleiche Weise isoliert werden. Zum Waschen wurden die Zellen oder Gewebe in 0,65 osmolarer Manitollösung transferiert. Die Isolierung der Zygoten und drei *dap* Embryonen wurde im Zeitraum von September bis November 2005 abgeschlossen. Für die Isolation von sechs und acht *dap* Embryonen wurde das Endosperm mit dem eingebetteten Embryo unter dem Binokular mit Pinzette und Skalpell vom Nuzellusgewebe der Samenanlage getrennt und in einer Petrischale mit 0,65 osmolarer Manitollösung gesammelt. Die Präparation der Embryonen wurde in der Petrischale manuell unter Verwendung von Glasnadeln mit Hilfe eines inversen Mikroskops durchgeführt. Die Längenmessung erfolgte unter Zuhilfenahme des Mikroskopfadenkreuzes und eines Mikrometermaßes. Nach der Vermessung der Embryonen und des Endosperms wurden beide Gewebe getrennt in Plastikreaktionsgefäße bis zu einer Stückzahl zwischen 20 und 25 gesammelt. Alle vier zu vergleichenden Genotypen (elterliche Inzuchtlinien und reziproke Hybriden) wurden an einem Tag innerhalb von sechs Stunden in unterschiedlicher Reihenfolge zu jeweils 20 bis 50 Stück isoliert. Die Isolation der sechs *dap* Embryonen fand im Jahr 2004 zwischen Mai und September an 11 Tagen und im Folgejahr zwischen April und November an 15 Tagen statt, während acht *dap* Embryonen nur jeweils einmal im Mai, September und Oktober des Jahres 2005 isoliert wurden.

Die frei präparierten Zellen und Gewebe wurden generell in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C verwahrt.

### 2.2.3 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie

Die sechs *dap* Embryogewebe der Hybride und Inzuchtlinien der Genotypkombination UH301/UH005 wurden mit Hilfe der Mikrodissektionstechnik isoliert (Kapitel 2.2.2), in 50% Ethanol:Formalin:Essigsäure Lösung (90:2:5, pro Volumen) fixiert, zwei Mal mit 70% Ethanol gewaschen und bei 4°C in 70% Ethanol verwahrt. Die Zellwände der Embryonen wurden durch 5 min Inkubation in Calcofluor White Lösung (3 mg/ml) angefärbt und die Embryonen anschließend mit 650 mosmolarer Manitollösung gewaschen. Das Bildmaterial der Calcofluor White gefärbten Embryonen wurde an der Technischen Universität Braunschweig unter Verwendung des Laser-Scanning-Mikroskops cLSM510 META (C. Zeiss, Göttingen, D) aufgenommen. Hierzu wurde ein C-Apochromat 40x/1.2 Wasserobjektiv eingesetzt, das Probenmaterial mit einem UV Laser und einem Argon Ionen Laser bei 364nm bzw. 488nm angeregt und die Emission bei 545nm und 635nm erfasst. Die Bildgröße betrug 1024x1024 Pixel. Die Bilder wurden im MBD-Format abgespeichert und über die Software „Zeiss cLSM Image“ (C. Zeiss, Göttingen, D) ausgewertet.

### **2.2.4 Statistische Analyse der phänotypischen Daten**

Zur Erfassung von Heterosis wurden die Werte für „Mid Parent Heterosis“ (MPH:  $((H - (P_1 + P_2/2)) / (P_1 + P_2/2)) * 100 + 100$ ), „Best Parent Heterosis“ (BPH:  $((H - P_B) / P_B * 100 + 100)$ ) und „Maternal Heterosis“ (MH:  $((H - P_M) / P_M * 100 + 100)$ ) über die gegebenen Formeln in Excel berechnet.

MPH > 100% kennzeichnet einen Größenzuwachs zum elterlichen Durchschnitt der Inzuchtlinien, BPH > 100% beschreibt den Größenzuwachs zur größten Inzuchtlinie und MH > 100% zeigt den Größenzuwachs zur mütterlichen Inzuchtlinie auf.

Die Signifikanz der in Tabelle 1 angegebenen BPH- und MPH-Werte wurde, wie in Meyer et al. 2007 beschrieben, durch einen „Welch zwei Proben T-Test“ in der Software „R“ (R Development Core Team, 2005) überprüft.

Die in den Abbildungen 7 und 11 wiedergegebenen P-Werte, die die Signifikanz von Heterosis aufzeigen, wurden von B. Keller (AG Piepho, Universität Hohenheim, D) über statistische Analysen mit dem SAS System für Windows (Version 9.1) ermittelt, denen das Modell „Länge = Genotyp + Erntetag + Restfehler“ (fester Effekt: Genotyp, zufälliger Effekt: Erntetag) zugrunde lag.

Unter Einbezug aller Messdaten wurde die Verschiedenheit der Hybridgröße in Hinblick auf die mütterliche Inzuchtlinie, den elterlichen Durchschnitt, bzw. die größte Inzuchtlinie in Excel mit einem zweiseitigen studentischen T-Test überprüft. 1)  $H_0: H = P_M$ ; Bei  $P \leq 0,05$  und  $H - P_M > 0$  wurde ein signifikanter Größenzuwachs im Vergleich zur mütterlichen Inzuchtlinie angenommen. 2)  $H_0: H = (P_1 + P_2) / 2$ ; Bei  $P \leq 0,05$  und  $H - (P_1 + P_2) / 2 > 0$  wurde ein signifikanter Größenzuwachs im Vergleich zum elterlichen Durchschnitt festgestellt. 3)  $H_0: H = P_B$ ; Bei  $P \leq 0,05$  und  $H - P_B > 0$  wurde ein signifikanter Größenzuwachs im Vergleich zur größten Inzuchtlinie angenommen.

Die Daten, die durch die Auswertung des Bildmaterials der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie ermittelt worden waren, wurden in Excel erfasst und anschließend Mittelwerte sowie Standardabweichungen berechnet. Zur Überprüfung des Zusammenhangs von Zellzahl und Embryolänge wurde eine PEARSON-Korrelation auf der Basis der Mittelwerte in Excel durchgeführt.

Um die Signifikanz der Daten zur Embryolänge und Zellfläche zu überprüfen, wurden zweiseitige studentische T-Tests eingesetzt.  $H_0: \text{Genotyp1} = \text{Genotyp2}$ ,  $P < 0,05$  zeigt signifikante Ungleichheit.

### **2.2.5 Allgemeine molekularbiologische Arbeiten**

Die molekularbiologischen Standardmethoden wie die Isolierung von Plasmid-DNA, Ligation, Restriktion, Aufreinigung, Fällung, gelelektrophoretische Auftrennung und Quantifikation von DNA-Fragmenten wurden, wenn nicht anders beschrieben, nach Sambrook *et al.* (1989) durchgeführt. Bei der Verwendung von modifizierenden Enzymen und Kits wurde, soweit nicht anders angegeben, nach den Angaben der Hersteller verfahren.

Die Sequenzierung von Genfragmenten wurde von der Firma „DNA Cloning Service“ (Hamburg, D) durchgeführt.

### **2.2.6 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)**

Die Durchführung von PCR-Reaktionen orientierte sich an den Herstellerangaben. Ein Standard-PCR-Ansatz setzte sich aus 1x Taq-Puffer [(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>], 2mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM dNTPs, je 0,1µM Oligonukleotide und 1,25U Taq-Polymerase pro 25µl Ansatz zusammen. Die Templatemenge betrug 10ng für Plasmid-DNA, 50ng für cDNA und 100ng für genomische DNA. Die Reaktion wurde im Thermocycler von Biometra (mit oder ohne Gradientenfunktion, Göttingen, D) im 0,2ml Reaktionsgefäß bzw. im 96 Well Format durchgeführt. Das Temperatur/Zeit-Protokoll lautete wie folgt: 2min Denaturierung der doppelsträngigen DNA bei 96°C, gefolgt von 35 Zyklen, beginnend mit 45sec bei 96°C, 45sec spezifische Annealingtemperatur (den Angaben des Oligonukleotidherstellers entsprechend), 1min pro kbp Amplifikat bei 72°C, finale Elongation für 5min bei 72°C und Reaktionsstopp bei 4°C.

### **2.2.7 cDNA-Synthese**

Die Isolierung der mRNA von 25 Zygoten bzw. Embryogewebe (Kapitel 2.2.2) wurde mit magnetischen oligo-dT(25)-beads (Dynal, Hamburg, D) den Angaben von Le *et al.* (2005) entsprechend durchgeführt. Für die mRNA-Isolierung aus Endospermgewebe (Kapitel 2.2.2) wurden die Volumen der Lösungen verdoppelt.

In der Erststrang-cDNA-Synthese, bei der der „Template Switch“ Mechanismus am 5'Ende der cDNA (SMART) zum Einsatz kam, wurden die in 3µl resuspendierten beads mit RNA eingesetzt. Sowohl die cDNA-Synthese als auch die anschließende „long-distance“ PCR (LD-PCR) wurden nach Herstellerangaben (BD Bioscience Clontech, Erembodegem, Belgien) durchgeführt. Die Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide sind in Kapitel 2.1.3 angegeben. Für jeden Zell- und Gewebetyp bzw. für jedes Entwicklungsstadium wurde die optimale Zyklenanzahl in der LD-PCR empirisch mit einem Probevolumen der Reaktion bestimmt, um sicher zu stellen, dass die cDNA-Amplifikation in der exponentiellen Phase der PCR-Reaktion abgestoppt wird. Bei der Herstellung aller cDNA-Proben wurde ein Zyklus weniger genutzt, als zum Erreichen des PCR-Plateaus benötigt worden wäre. Diese LD-PCR-Bedingungen führten zu gleichen cDNA-Konzentrationen der Proben von ungefähr 20ng/µl für jedes Gewebe. Die auf diese Weise erzeugte cDNA wurde in cDNA-Subtraktionsreaktionen, für Microarrayhybridisierungen und allelspezifische Expressionsuntersuchungen genutzt. In den Expressionsanalysen auf der Basis der qRT-PCR wurde ebenfalls amplifizierte SMART-cDNA eingesetzt. Die Amplifikation wurde allerdings nur über 14 Zyklen durchgeführt. Das sind ungefähr vier bis sechs Zyklen weniger, als nötig gewesen wären, um das PCR-Plateau zu erreichen. Diese Art der Durchführung stellt sicher, dass die relativen Transkriptverhältnisse der cDNAs erhalten bleiben, weil die Reaktion in der exponentiellen Phase verbleibt (Meyer *et al.* 2007).

### **2.2.8 Suppressive subtraktive Hybridisierung (SSH)**

Die Erzeugung von subtrahierten cDNA-Populationen verschiedener Subtraktionsrichtungen (301x005-005x005, 005x005-301x005 bzw. 301x005-301x301, 301x301-301x005) aus sechs dap Embryo- bzw. Endospermgewebe der Inzuchtlinien und Hybride wurde unter Verwendung des PCR-Select cDNA Subtraktionskit (BD Bioscience Clontech, Erembodegem, Belgien) unter Beachtung der Herstellerangaben durchgeführt. Zur Überprüfung der Subtraktionseffizienz wurden die in Kapitel 2.1.3 aufgeführten Oligonukleotide, wie vom Hersteller des Subtraktionskits angegeben, in PCR-Reaktionen eingesetzt. Subtrahierte cDNA-Populationen, die für cDNAs des Embryo- bzw. Endospermgewebes des Hybrids 301x005 angereichert waren, wurden mit dem pGEM<sup>®</sup>-T Easy System (Promega, Mannheim, D) entsprechend den Herstellerangaben kloniert und in *Escherichia coli* Bakterien des Stammes XL1-Blue (BD Biosciences, Heidelberg, D) transformiert. Die transformierten Bakterien wurden auf Luria Bertani (LB) Agarplatten [10g Baktotrypton, 5g Hefeextrakt, 5g NaCl, add. 1000ml Aqua bidest, pH: 7,0, 1,5% (w/v) Agar, autoklaviert] mit Ampicillin, die oberflächlich mit X-Gal [0,8mg] und IPTG [0,8mg] versehen wurden, bei 37°C angezogen. Für jede subtrahierte cDNA-Population (301x005-301x301, 301x005-005x005) aus Embryo- bzw. Endospermgewebe wurden 480 rekombinante weiße Kolonien ausgewählt und in flüssigem 100µl LB-Medium mit Ampicillin im 96 Well-Format über Nacht bei 37°C kultiviert. Zum Anlegen von Glycerinkulturen wurden die Bakterienkulturen zu einer Endkonzentration von 25% mit Glycerin versetzt, mit einer 96er Noppenmatte (Nalge Nunc International, Neerijse, Belgien) verschlossen und bei -70°C gelagert.

### **2.2.9 Microarrayproduktion**

Von den verschiedenen Bakterienkulturen der angereicherten cDNA-Banken dienten 2µl als Template in einer PCR-Reaktion, um die individuellen cDNA-Fragmente mit Hilfe der Oligonukleotide NP1 und NP2R (BD Bioscience Clontech, Erembodegem, Belgien), die an die flankierenden Adaptersequenzen binden, zu amplifizieren. Die PCR-Produkte wurden auf einem 1% Agarosegel visualisiert, um die Qualität und Quantität der Amplifikation zu überprüfen, und nachfolgend im 96 Well Format mit PCR-Clean-up-Platten (Millipore, Eschborn, D) maschinell (Genesis RSP 100 (Tecan)) aufgereinigt. Nur erfolgreich amplifizierte Genfragmente, die sich durch die Amplifikation von Einzelbanden auszeichneten, wurden als Microarraysonden eingesetzt. Genfragmente des Gens *uidA* (Sequenzlänge 462 bp, *Escherichia coli*), des humanen Östrogenrezeptors (Sequenzlänge 464 bp), des Gens *gfp* (Sequenzlänge 378 bp, Pang *et al.*, 1996) und des Gens *DsRed-1* (Sequenzlänge 680 bp, Biosciences Clontech, Erembodegem, Belgien) wurden mit den im Kapitel 2.1.3 angegebenen Oligonukleotiden amplifiziert und, wie zuvor beschrieben, aufgereinigt, um als Kontrolle der Microarrayhybridisierungen bei der Datennormalisierung zu dienen. Die Microarraykontrollfragmente wurden so eingesetzt, dass sie zum einen zufällig über das ganze Array verteilt gedruckt wurden, zum anderen sich in jedem Block des Arrays an definierten Positionen befanden. Die aufgereinigten PCR-Produkte wurden auf das 384

Well Format umformatiert, getrocknet und in 15µl Spotting-Puffer [3x SSC, 1,5M Betain] resuspendiert. Die Genfragmente wurden auf Poly-L-Lysin beschichtete Glasobjektträger (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D) mit Hilfe des Microgrid II Robotors (BioRobotics, Boston, MA, USA) gedruckt.

### **2.2.10 Differentielles Screening**

Jeweils 380 Bakterienklone der zwei subtrahierten cDNA-Banken (301x005-301x301; 301x005-005x005), die für ausschließlich oder stärker exprimierte cDNAs in Hybridembryonen angereichert waren, wurden, wie in Kapitel 2.2.9 beschrieben, einer PCR unterworfen, um die auf den Vektoren befindlichen Genfragmente zu amplifizieren. Die überprüften und aufgereinigten Genfragmente der jeweiligen cDNA-Banken wurden zusammen mit Microarraykontrollen (Kapitel 2.2.9) auf Poly-L-Lysin beschichtete Glasobjektträger in vierfacher Wiederholung gedruckt, hybridisiert und analysiert entsprechend den Angaben von Le *et al.* (2005). Für die Hybridisierungsreaktionen wurden die jeweiligen über die SSH-Methode (Kapitel 2.2.8) subtrahierten cDNA-Populationen (301x005-301x301, 301x301-301x005 bzw. 301x005-005x005, 005x005-301x005), die für Inzucht- bzw. Hybrid-cDNAs von sechs dap Embryonen angereichert waren, und die nicht subtrahierten Ausgangspopulationen (301x005, 005x005, 301x301) aus 6 dap Embryonen eingesetzt. Vor der Markierungsreaktion erfolgte zusätzlich zu der Zugabe der Genfragmente der Microarraykontrollen *uidA* und Östrogenrezeptor (je 10ng) in die auf einem Array zu hybridisierenden cDNA-Populationen die Zugabe der Genfragmente *gfp* bzw. *DsRed-1* (5ng) ausschließlich in jeweils nur eine cDNA-Population. Alle Hybridisierungen wurden mit einem Farbstoffwechsel bei der cDNA-Markierung wiederholt. Die Konfidenzniveaus der Genexpressionsunterschiede wurden, wie in Meyer *et al.* (2007) beschrieben, bestimmt.

### **2.2.11 Produktion, Hybridisierung und Analyse des Heterosis-3k-Arrays**

Insgesamt 947 und 938 cDNA-Fragmente der angereicherten cDNA-Banken aus sechs dap Embryo- bzw. Endospermgewebe wurden, wie in Kapitel 2.2.9 beschrieben, amplifiziert, überprüft und aufgereinigt sowie für die Microarrayproduktion vorbereitet.

Die cDNAs aus Eizellen und Zentralzellen sowie die Genfragmente der konstitutiv exprimierten Kontrollgene wurden von S. Scholten (Universität Hamburg, D), die Genfragmente der Chromatin assoziierten Proteine und Retrotransposons von J. F. Gutiérrez-Marcos (Universität Oxford, GB), die cDNAs aus dem Zweizellstadium von Mais von T. Okamoto (Universität Tokio, Japan) und weitere 7 Genfragmente von der AG Prof. Dr. Geiger (Universität Hohenheim, D) zur Verfügung gestellt. Die vier Microarraykontrollen wurden, wie in Kapitel 2.2.9 und Kapitel 3.5.1 beschrieben, eingesetzt. Die 3062 Genfragmente wurden so auf Poly-L-Lysin beschichtete Glasobjektträger in zweifacher Wiederholung gedruckt, dass die DNAs in 32 Blöcken a 16x17 Spotts organisiert waren, wobei in den Reihen 9-16 jedes Blocks die Wiederholung der in Reihe 1-8 gedruckten DNAs vorgenommen wurde (Abb. 16A).

Die Hybridisierungen mit dem Heterosis-3k-Array erfolgten nach dem in Abbildung 16B gezeigten Hybridisierungsschema im so genannten loop-Design und wurden, wie von Le *et al.* (2005) beschrieben, durchgeführt und am ArrayWorx-Microarray-Reader (AppliedPrecision, Issaquah, WA, USA) gescannt. Für die Untersuchung der Genexpressionsunterschiede zwischen den Genotypen der intrapool Kreuzung UH250/UH301 wurden 24 Hybridisierungen unter Einsatz von 3 biologischen Replikaten vorgenommen. Das für diese Untersuchungen benötigte sechs dap Embryo- und Endospermgewebe wurde im Juni und Juli 2004 sowie Mai 2005 isoliert (Kapitel 2.2.2). Für die Vergleiche innerhalb der interpool Genotypkombination UH301/UH005 wurden 32 Hybridisierungen auf der Grundlage von 4 biologischen Wiederholungen durchgeführt. Das für die Analysen verwendete sechs dap Embryo- und Endospermgewebe wurde im Mai, Juni, Juli sowie September 2004 isoliert. Die cDNA-Synthese aus dem Probenmaterial erfolgte wie unter 2.2.7 beschrieben.

Vor der Markierungsreaktion erfolgte zusätzlich zu der Zugabe der Genfragmente der Microarraykontrollen *uidA* und Östrogenrezeptor (je 10ng) in die auf einem Array zu hybridisierenden cDNA-Populationen die Zugabe der Genfragmente *gfp* bzw. *DsRed-1* (5ng) ausschließlich in jeweils nur eine cDNA-Population. Die zu untersuchenden cDNA-Populationen wurden mit den Farbstoffen Cy3 und Cy5 (Amersham, Biosciences, New York, USA) im Wechsel markiert, wie es beispielhaft für die cDNA aus Embryogewebe der interpool Genotypkombination UH301/UH005 in Tabelle 6 aufgelistet ist.

Die durch das Scannen der hybridisierten Microarrays gewonnen Bilddateien wurden zur Datenerfassung mit der Software „GENEPIX 4.0“ (Axon Union City, CA, USA) ausgewertet. Alle DNA-Spots mit höherem Hintergrund- als Vordergrundsignal wurden aus der weiteren Auswertung ausgeschlossen. Die bioinformatische Auswertung der Hybridisierungsdaten erfolgte an der Universität Hohenheim in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. H. P. Piepho durch B. Keller, wobei alle Berechnungen im SAS System für Windows (Version 9.1) durchgeführt wurden.

Zur Normalisierung wurden eine intensitätsabhängige Loess-Regression und ein Scaling eingesetzt. Das Scaling dient der Normalisierung zwischen den verschiedenen Microarray-hybridisierungen und ermöglicht den Vergleich der Hybridisierungsdaten. Hierzu wurden die Mittelwerte und Standardabweichungen der Signalwerte der verschiedenen Arrays auf einen über die Arrays gemittelten Wert standardisiert. Nachfolgend wurden die normalisierten Daten aller Microarrayhybridisierungen eines Gewebetyps zusammengefasst und getrennt nach den Gewebetypen ein gemischtes Modell für jeden Spot angepasst, um  $\log_2$ -Daten für jedes Gen zu generieren. Genotyp, Farbstoff, Genotyp\*Farbstoff-Interaktion und Druck/Spoteffekt wurden als feste Effekte im Modell berücksichtigt; Objektträger, Objektträger\*Druck/Spot-Interaktion und Objektträger\*Farbstoff-Interaktion als zufällige Effekte. Bei den Mikroarraykontrollen wurden außerdem zufällige Effekte für Objektträger\*Block\*Farbstoff und Objektträger\*Block berücksichtigt, weil diese Genfragmente in verschiedenen Blöcken des Arrays gedruckt wurden. Über die im Modell geschätzten Effekte wurden die Genotypdaten, die Vergleiche der verschiedenen Genotypen und die Daten zur Bestimmung des Expressionsverhaltens der Hybride [Embryo:  $H-(P_1+P_2)/2$ ]

und Endosperm  $H-(P_1+P_2)/3$ ] für bestimmt.  $P$ -Werte, die die Signifikanz der Daten wiedergeben, wurden ermittelt und mit der FDR-Methode (Benjamini und Hochberg, 1995) adjustiert.

Bestimmung des Expressionsverhalten: Es wurden nur Daten zugelassen, die die Voraussetzung  $P < 0,1$  erfüllten. Additiv:  $H(+/- 10\%H) = (P_1+P_2)/2$ ; Überdominant:  $H > P_B$ ; Unterdominant:  $H < P_L$

### 2.2.12 Sequenzanalyse

Die inserierten Genfragmente der Plasmide ausgewählter Klone wurden sequenziert. Auf der Grundlage der Sequenzen wurden mit der Software „SeqTools“ eine Clusteranalyse und Datenbankrecherchen, wie in Meyer *et al.* (2007) beschrieben, durchgeführt.

### 2.2.13 Quantitative RT-PCR

Quantitative RT-PCR (qRT-PCR) wurde genutzt, um das relative Expressionsniveau der untersuchten Gene in sechs dap Embryogewebe der Inzucht- und Hybridgenotypen der interpool Kreuzung UH301/UH005 zu bestimmen. Die Embryonen wurden wie im Kapitel 2.2.2 beschrieben im Mai, Juni und Juli 2005 isoliert. Die cDNA Synthese erfolgte nach den Angaben im Kapitel 2.2.7. Die Amplifikationseffizienz der Oligonukleotide (Kapitel 2.1.3) wurde unter Einsatz sequenzspezifischer PCR-Produkte überprüft, die als Template in gestaffelter Konzentration (1ng-1fg) in die Test-qRT-PCR Reaktionen gegeben wurden. Oligonukleotide, die eine Amplifikationseffizienz zwischen 83,2% und 100% aufwiesen, und gleiche cDNA Mengen jedes Genotyps wurden in den qRT-PCR Analysen eingesetzt. Zur Normalisierung wurde das in Mais konstitutiv exprimierte Gen *Aktin* verwendet. Neben der dreifachen Wiederholung der qRT-PCR mit unabhängigen biologischen Replikaten wurde jede Untersuchung eines Gens mit dreifacher Wiederholung des Ansatzes, wie in Meyer *et al.* (2007) beschrieben, durchgeführt.

#### Berechnung des Expressionsunterschiedes

Mit Hilfe der allgemeinen Gleichungen  $x = (C_t - b)/m$  und  $y = 10^x$  konnte die Transkriptmenge der Inzuchtlinien UH301 und UH005 berechnet werden. Die zur Berechnung benötigten Variablen  $b$  und  $m$  waren für das jeweilige Gen durch den Effizienztest des entsprechenden Oligonukleotids und die Variable  $C_t$  durch den Mittelwert der für das jeweilige Gen in den qRT-PCR-Analysen detektierten  $C_t$ -Werte gegeben. Mit der Gleichung  $z = T_h/T_s$ , wobei  $T_h$  die Transkriptmenge der stärker exprimierenden Inzuchtlinie und  $T_s$  die Transkriptmenge der schwächer exprimierenden Inzuchtlinie ist, wurde der Expressionsunterschied errechnet.

Die statistischen Analysen zur Auswertung der qRT-PCR Daten wurden, wie in Meyer *et al.* (2007) beschrieben, ausgeführt.

### Differentielles Screening

Zweiseitige studentische T-Tests wurden eingesetzt, um Expressionsunterschiede zwischen dem Embryogewebe des Hybrid 301x005 und der elterlichen Inzuchtlinien UH301 bzw. UH005 aufzuzeigen. Bei den Genen BF4-DH2 erfolgte die Überprüfung von  $H_0: 301x005=005x005$ , bei den Genen FB10-IE11 die Überprüfung von  $H_0: 301x005=301x301$ . Bei  $P \leq 0,02$  wurden Expressionsunterschiede zwischen Inzuchtlinie und Hybrid angenommen. Die Überprüfung des Expressionsverhaltens erfolgte ebenfalls über zweiseitige studentische T-Tests: 1)  $H_0: 301x005=(301x301+005x005)/2$  bzw.  $H_0: 005x301=(301x301+005x005)/2$ ; Bei  $P \leq 0,02$  wurde eine Abweichung vom additiven Expressionsmuster angenommen. 2)  $H_0: 005x301=301x301$  bzw.  $H_0: 005x301=005x005$ ; Mit  $P \leq 0,1$  und  $005x301 > 301x301$  bzw.  $005x301 > 005x005$  wurde eine überdominante Expression festgestellt.

### Bestimmung von Expressionsmustern

Unter Verwendung zweiseitiger studentischer T-Tests wurden die Hypothese  $H_0: H=(P_1+P_2)/2$  überprüft. Bei  $P \leq 0,15$  erfolgte die Klassifikation des Expressionsverhaltens in Hybridembryonen als nicht additiv. Die Überprüfung der Hypothese  $H_0: H=P_B$  ermöglichte eine Differenzierung der nicht additiven Expression. Mit  $P \geq 0,15$  wurde ein dominantes Expressionsverhalten ( $H \neq (P_1+P_2)/2 \cap H=P_B$ ) festgestellt. Bei  $P \leq 0,15$  wurde ein semidominantes Expressionsverhalten ( $H \neq (P_1+P_2)/2 \cap H \neq P_B \cap H-P_B < 0$ ) angenommen, wenn gleichzeitig  $H-P_B < 0$  zutraf. Bei  $P \leq 0,15$  und  $H-P_B > 0$  wurde ein überdominantes Expressionsverhalten ( $H \neq (P_1+P_2)/2 \cap H \neq P_B \cap H-P_B > 0$ ) festgestellt.

## **2.2.14 Allelspezifische Expressionsanalysen**

Um geeignete Polymorphismen für die allelspezifischen Expressionsanalysen zu identifizieren, wurden die in Kapitel 2.1.3 aufgeführten Oligonukleotide zusammen mit cDNA aus sechs dap Embryonen der Inzuchtlinie UH301 bzw. UH005 (Kapitel 2.2.7) in einer PCR-Reaktion eingesetzt. Die amplifizierten Genfragmente wurden direkt sequenziert (Kapitel 2.2.5) und die Sequenzen mit geeigneter Software (Kapitel 2.1.6) ausgewertet.

Die Isolation der mRNA und die cDNA-Synthese aus drei unabhängigen biologischen Replikaten, die jeweils 20 bis 25 Zygoten, drei, sechs bzw. acht dap Embryonen umfassten (Kapitel 2.2.2), wurde, wie in Kapitel 2.2.7 beschrieben, durchgeführt. Für jedes Entwicklungsstadium wurde die cDNA beider reziproker Hybride der Genotypkombination UH301/UH005 isoliert. Um die Expressionsregulation in sechs und acht dap F1-Embryonen überprüfen zu können, wurde zusätzlich cDNA der sechs und acht dap Inzuchtlinien UH301 und UH005 hergestellt. Die genomische DNA (gDNA) der Inzuchtlinien UH301 und UH005 sowie des Hybrids 301x005 wurde aus Blättern von jungen Keimlingen, wie in Scholten *et al.* (2002) beschrieben, isoliert. Alle cDNA- und gDNA-Lösungen wurden auf eine Endkonzentration von 100ng/μl eingestellt und in Reinform bzw. entsprechender Mischung zur allelspezifischen Expressionsanalyse an Herrn N. Storm der Firma „Bioglobe“ (Hamburg, D) weitergegeben. Die Analysen wurden mit dem MassARRAY-System (Sequenom), wie in

Ding (2006) publiziert, durchgeführt. Angaben zum PCR-Design sind nachfolgend in der Übersicht gegeben. Die Auswertung der Daten erfolgte unter Berücksichtigung der in einer Vorauswertung der Firma „Bioglobe“ festgestellten Datenqualität. Daten minderer Qualität wurden ausgeschlossen. Die gDNA-Daten des Hybrids 301x005 (allelisches Verhältnis 1:1) wurden zur Normalisierung aller Expressionsdaten genutzt, während die gDNA-Daten der Inzuchtlinien UH301 und UH005 in Mischungen mit verschiedenen Verhältnissen (1:4, 1:20, 20:1, 4:1) oder in Reinform (1:0, 0:1) verwendet wurden, um die Analyse zu kontrollieren und die Detektionsgrenzen für jede Einzeluntersuchung zu bestimmen (Kapitel 7.1: Tab. 16). Ebenfalls zur Kontrolle der Analysen wurde die cDNA der Inzuchtlinien in Reinform (1:0; 0:1) eingesetzt. 1:1 Mischungen der Inzuchtlinien-cDNA dienten der Analyse der Expressionsregulation.

Für die statistische Analyse der Daten wurden die normalisierten Werte genutzt (Kapitel 7.1: Tab. 17) und Werte außerhalb der Detektionsgrenzen entsprechend durch 1 bzw. 0 ersetzt. Die Analyse wurde in Excel durchgeführt.

### Paternale Genomaktivierung und allelspezifische Genexpression im Embryo

Zur Darstellung der allelspezifischen Expressionsdaten wurde der Quotient (Allel005/Allel301) von allen Einzelwerten der 1, 3, und 6 dap Hybride 005x301 bzw. 301x005 errechnet und der Mittelwert sowie das 95%-Konfidenzintervall bestimmt. Die Signifikanz elterlicher Effekte wurde über einen zweiseitigen studentischen T-Test ermittelt:  $H_0$ : Allel005(Hybrid301x005)=Allel005(Hybrid005x301). Bei  $P \leq 0,05$  wurde der Einfluss elterlicher Effekte angenommen, wobei es sich dann um mütterliche Effekte handelte, wenn  $\text{Allel005(Hybrid005x301)} - \text{Allel005(Hybrid301x005)} > 0$ . Die prozentuale Einflussnahme E wurde über  $E(\%) = \frac{|\text{Allel005(Hybrid005x301)} - \text{Allel005(Hybrid301x005)}|}{\text{Allel005(Hybrid005x301)} + \text{Allel005(Hybrid301x005)}} \cdot 100$  berechnet. Die allelische Präferenz wurde über einen zweiseitigen studentischen T-Test bestimmt:  $H_0$ : Allel005(Hybrid301x005)=Allel301(Hybrid301x005) bzw. Allel005(Hybrid005x301)=Allel301(Hybrid005x301). Bei  $P \leq 0,05$  wurde eine verstärkte Präferenz für ein Allel angenommen.

### Expressionsregulation in sechs und acht dap F1-Embryonen

Zur graphischen Darstellung wurden der Quotient  $Q = \text{Allel005} / \text{Allel301}$  für die reziproken sechs bzw. acht dap Hybride und die 1:1 cDNA-Mischungen der sechs bzw. acht dap Inzuchtlinien UH301 und UH005 für alle Einzeldaten berechnet, der Mittelwert und das 95% Konfidenzintervall bestimmt.

Auf der Basis von zweiseitigen studentischen T-Tests wurde die Regulationsart nach Stupar und Springer (2006) für jedes untersuchte Gen der sechs und acht dap Hybridembryonen bestimmt: 1) Überprüfung der  $H_0$ : Allel005=Allel303 in der 1:1 Mischung; Bei  $P \leq 0,05$  wurde angenommen, dass die Allele in den Inzuchtlinien signifikant unterschiedlich exprimiert sind. 2) Überprüfung der  $H_0$ :  $Q(\text{Hybrid } 301 \times 005) = Q(1:1 \text{ Mischung der Inzuchtlinien})$  bzw.  $Q(\text{Hybrid } 005 \times 301) = Q(1:1 \text{ Mischung der Inzuchtlinien})$ ; Bei  $P \leq 0,05$  wurde keine ausschließliche *cis*-Regulation angenommen. 3) Überprüfung der  $H_0$ :  $Q(\text{Hybrid } 301 \times 005) = Q(\text{Hybrid } 005 \times 301)$

301x005)=Q(gDNA 301x005) bzw. Q(Hybrid 005x301)=Q(gDNA 301x005); Bei  $P \leq 0,05$  wurde keine ausschließliche *trans*-Regulation angenommen.

Für die Einstufung entsprechend der drei Regulationsarten (*cis*, *trans*, *cis/trans*) mussten folgende Voraussetzungen erfüllt sein: *Cis* ( $H=1:1$ Mischung); *trans* ( $H \neq 1:1$ Mischung  $\cap H=gDNA$ ); *cis/trans* ( $H \neq 1:1$ Mischung  $\cap H_0: H \neq gDNA$ ).

## Übersicht über das PCR-Design der allelspezifischen Expressionsuntersuchungen

Die Sequenzen der untersuchten Gene, die verwendeten polymorphen Genorte sowie Informationen zu den genutzten Oligonukleotiden (Sequenz und Bindungsstelle) sind gegeben.

PCR-Oligonukleotid 1: Kennzeichnung durch fett gedruckte, unterstrichene und kursive Buchstaben

Polymorphismen: Kennzeichnung der analysierten polymorphen Genorte durch fett gedruckte, rote Buchstaben, die in Klammern stehen. Innerhalb der Klammern sind die in den Genotypen UH301 und UH005 vorkommenden Nukleotide nebeneinander, getrennt durch einen Schrägstrich, dargestellt. Alternative polymorphe Genorte sind durch schwarze Buchstaben in Klammern aufgezeigt. Weitere Polymorphismen und/oder unbekannte Basen werden über den Buchstaben N erfasst.

Extensionsoligonukleotid: Kennzeichnung: grau hinterlegte, unterstrichene Buchstaben

### EH038207 [162 – 375 bp]

**GTGAGATTACTGAAAGGATT**CAATGTCTNTA**[C/T]**GCATTCCATATTCAGCAAC**TTTCATATAACGGTTCCA**[TTATGGCATAGTTATAGTT/-]CAAGATTACACTGAATGTTNAGCAGTNTGCACGGTNGACNTTTCACNTTTAATTGAGTGACTGGNCGNCTATGCATGGCTCC[C/T]TGGTCATATTACTTTCATT**TAACGTTTGCTACTGGTGGG**

### EH38206 [147 – 538 bp]

CAAATTCACAAGCCCT**TGTAGACATCTTGTGGCCTC**TCATGAAAAGTCTTAGTCTCTGA[T/C]TCTGAAGCTGAGACCTCGGCCTGCTTATGTGCAGCGACTCCATCCTCACAAAT**[A/C]**TCGGCATCGTCCTGCTCAATGATGGCCTTGACGACTGCATTTCGACAGATCCCCATCGTCGCTGGCTCGAAGTAGCAGCCTCGATCA[C/T]GTGCGTCCTCACTATTTCTG**CAAACTGACTTGCTGCTGGA**CAAAAGTCGCTCCATTTCTACTATCCATAACAATGCTTAGCCCTTGTCATGCCACGTTGGTCTCTGCAGGTTTGTGAGGAACCAACAGAACCAGCTCCATTGCTCTCACTGTAGATATGATGAGGACATCTTCC

### EH038219 [70 – 279 bp]

RA**TAGCTTCGCTAAAGAAATTGG**CNAGGAGCATANAATTC**[-T]**CTTACAATTTGCAGAGGGTA**TAATCAGAAAAACAGCACCCCGACCCCGGG****CAGCACAGATGTACTA**AAAACCTATCGTCTGAATATCAGGCTAATGACATTTGGTCTTTACAATACTGTGATGCAATAAACTGGGCAAAACCATGATACCATCGTATACASTAAG

### EH038208 [38 – 402 bp]

TTGGCAGAAGCCAACGTCAAGAGTGCCATAACTCCAACCTGCCTCTTTAGGTTTGAACCCCTCTCTGTGCGTAAAGACTTCCACCTTTGCCATGCCTTGACAGAAAACGTTACGCTCCCACTCACTTCAACAGATGCAACTCGACGACCAAGTGTGATAGTGCCATCATCAGAAACAGGCAGTTTATCGTCCCAAGATCAAGCAAGACAACCTCCTCAGACCTATACTCACCGTGTGGGCAGCAAACCTGGGCACGGAGACCATCAGGCCATGACCCACCAAGAA**CTCGCACACTAATGTAGCCT**TCCACTGAGANAACAACAATTGCGAGA**[G/C]****CAAACCTCAGCGTGCTAAGCTGCTG**

### DW475393 [103 – 293 bp]

TCGCGTGGCTAGGCGCGGCGAGCTCATTGGACAAGC**AGTTCTCGACCTGGCTAAG**CAAGAC[C/A]TGGAGAGGGAGAAGGCTGCCAAAGACCAAG[A/G]GAAACTAGAACGCTCGTACTCA**[-GTA]****GTAAAGCCTGCAGAAGCGGCCTGGTGATGACTGGT**GGAGCAGCAGACAAATGGGTCGGCAGCAGCAAAGC

### EH038220 [152 – 542 bp]

AGCYGAGAAGGCNGATGGMGAAGATGAGAAAGTTATTCTNATGAACAGGAGACAGNTGTTCTGGTAAAGATGAAAAACTGTNCAGATGAWAAATCATAAAAAGANTA**AGGTGACTAATAAAAGAACAAGTGTG****[G/A]**CCAAAGAGGCTGGAGGGCATAAACCTGAACCTAATAGGTCAGGAAAGCATCTCAATAAAAATAAGGATACCGATACCAAGGAAGTTGATGGCC[C/T]GAAAGCACTGAAACAAATGGAGATGGNAAA**[G/A]**AAAGAGCA**ACGTGAACAACAAGCAACG**AGCCACAAAAGGAAGATNGATTCTGWATAAACTAAAAAATCTGGCCCTGTGAGCTTCTCGGGTGTCAAGAAAGAATCAGGTSAGTGGCAAGAAGAC

### EH038205 [86 – 362 bp]

AATGTAAGTCTCTGATGTTCCNTTGAATA**TGGAGGATTAGTCACTGAGAAAGCGTC****[G/A]****TGAACTTATTGAAGTTGTT**TCTGAAGTAGATGACAGCTTCTGAAGCTTTTCTCAATGATGAGCCAATAACAGCTAATCAGCTTAAGGCGGCTATTTCGAAGAGCTACAGTGGCACGGA[A/G]TTTCAT**ACCAGTATACATGGGAAGTGC**ATTCAAAAATAAGGGTGTCAACCACCTTCTTGATGGCGTCTGGATTATCTACCGTGGCCGTTGGAGGTT

**EH038221** [362 – 51 bp]

GIGCAAAAAAGAGAGCACTAAAATTGCAATCGAGCAGAGCCTCAGAGGCCAGTTAACCCCTTTTGCAAAATCATCATCAAGCAAAGAACAGTC  
ATCATCTCTTTAGATTTCCATAAAAAAAGTAAAGTTGAAAAACCCAACGCAAGAATTTGAAAATGAATTTACTTATGTCATGGCCCTGTAG  
GGGGCAAAATGTTAGACCTCCACTGACATCTGCAGGATCTATTTTTTTT[**T/-**]AGTTTCTCTGCTAGCATATGTAATAACCATTTACTTGTAAT  
TGTTCTCATGTTTGGTGGATTATTGTG

**EH038213** [548 – 975 bp]

TAATCTCTAGTATCAAAATATCTCGATTAACGCCGCCACCCAGAGCTCGTTGGAAT**GCTCTCTCCACCTCTTTCTC**AACTTAGAAATATGATCAT  
CATCC[**CT**]CAACCAGACTGCTGAAGAATCATCTTTAT**CTGGTAGAGTTGGATTGG**GANTCATNTNTGACCTATCATNATCAGGCACAGCAT  
G/AJCNCGAGCTNTTCAAGCTTTTCTTTAGGAATCGGGGCAATTGATTGCTCCATTNTTCCATGATCCCAGTATCAACACTTGTCCATATGTAACC  
GACAACACCACAGGTGCCAGTCTCGGATGTCCCAACTCATNTNTTCCGAAGGAACAGTTGCTTGATCACCATTACTCTCATACTNGAAAAATG  
GTGGACTANTNGCAATCCAGAGTTAGTGTACGACTACTCAAGTTCTTC

**EH038212** [97 – 415 bp]

GAGGAGCTGTTTAGTTTTGACCTCTGTAATCACATGAACTTGCTCTCGCAACCAACCTTCAGTAT**CAATCTCAGCTGACTCCACATCAATA**  
TTTGTGTCCCGCAT[**A/G**]ATCTTGATTATCTCAAGAAGTAGGCCAGGCCGAT**CGGCTGTCTCTATGTAAGC**ATGCTTCTTTTGGCCGCTGCTT  
CAACAACATATATGTTGCAATATCGATATCAACCTTCTCACAGGAGGTTTTATCCCAAAAAATTCACCATTGCCAACTTCTCACTTGATTACG  
GATGATACTGGAGCAGGTTGTTGATGATGGTA

**EH038216** [314 – 1 bp]

ACTAAAATGCACCTAGGGAAT**CAACAAGAAGTCAAG**AACACAAAAGTGTCTTTCTTT[**T/C**]CCACAACATGAACTGCTATAGTTTATGATCGTATAAT  
**GCCCTCCAATGAAGCTGAA**AATCTTAGACCCATCAAAAATATAGTCAATTCAAAAATAGAAGTTTGGGAAATTGGCATCTAAAATAAGTGCAT  
TTTGAGAAATTCGTTGAGGGAAGTACCAAGCTCTAGCTTTAGTTCTGCATCAGACTTGGTAGGCAGTGCATGATGAAGAACCCTTTCCACCT  
TTGTCACTACTGTATGCTTTTCTTTGCTT

**AB194864** [86 – 439 bp]

GGAAACCGCCAGCAGTCAACAGCTCCTAGCGTTTGGCCGTCGGTAACCCCT**AGTCATGCTTCAGGAGGTC**GACGAGACTTC[T/A]GAGGCC  
GCTGCCACTTGAAGGGG**TGGCCGACGATGACCCC**[**G/A**]TGCTCGCCGCTCCATGATGCTCGGGAGCC**GGTGAAGAAGGGGTGATCCA**AGCC  
GTGGCAGTGACCCGCTTCTCATGGTGTACATGCTTGACACCTTGAACCCGACAGGCTGGACACRCTGCTCGGGTGGCCAGGCTGACTGCT  
GGATCTCTGAGCTTGGAGACGCCACCTGGCCATGAGGGGGTGTGAACATTGCCTTGTGCCACCACCAGC

**EH038218** [958 – 457 bp]

AGTGGTGTATGCGCTCAGTTCC**TTCTTTGGAGACAAGTCCGC**ATCTTCTA[G/C]TTTGCCAAATAGCCTTCGACAGTTGAACTGTGTG[**CT**]**G**  
AGAATGTCGTCGAGGCCTT[G/A]CGACCACCAAAAATGGTACTG[G/C]CAGTGCCATCAAA**GAGGAATTGGTAGATGCAGC**CACCAAAGCAGCA  
GCAGCAGCAGCTCTCAACAAGATTAGGCCATGATGCACCGCATGGGCAGTCTTCGACAGCCAAAGGCGGACATGGAAATCGATGGTTGATTG  
TAGGTTCCAGAGTGGYAAAGAAAGGAATCCCTCTAATCATATGATACCTGTGGTCAAGATGTSCTGATATATTGTAACATCAAGAAAGCA  
CCTCCAGGCTGAGGGTGTACTGCTAATGCGTTTGGTTTACTGTNYCCTTGAATATGCATACACATTTAGAATCATGCAGCCATTKTGTGTG  
CTGAACCGGTGGATCGTGCCTGTTGCTTGTGA

**EH038214** [174 – 387 bp]

CTATATGTCAA**AGCTATTTCAAGCAGCAG**AGCTAG[G/A]ATCTCATTTTGTAGT[**CT**]TGGCATTGAAGTGATATCCATT**GTCAATAATCCTCTCTT**  
**CCT**TAATATTCGTTTACATGCATTTCTTTGCTCTAGCTGAAGCCTTCTTCTCAAGTTCATATGACAGATTGAACCTTCTTCTTTCTTTA  
TCCACATGACCACATCAAACTCC

**EH038209** [199 – 650 bp]

CACGGCTTCTGCTGCAGCAACGATGTCAGCTACTTCTGCTGAGATGATAGCATCGCTGCAGAACTTCTTGAAATTTGGCACTCGTGGTTCAGG  
AAGTCTGATAGCTCGTTCAACCATCTCTGCCTGGTCCCATCTAGGACTCCAGGGAT**AGTCATTTATCGGAGGCGACGTGATAGGC**[**G/A**]TCCCATCG  
GCATTACAGTGTGAGAATCTGCAGT[G/A]TGACGACAGTGTGTT**CTTTGGGAATTGAAGGGGA**TGGCAAAGTGAACCAAGAAATGTGAACAT  
TCCAGAAATGGAAAGAACTGTAGCCCTCTGCAAAAAATCGGATCAGCCTCTAATGGTCTCCAAAGATGGGAGCTAGTGCCCTCAATAAAGCGT  
CTTCTGGAACCAATTGAAGCCGACGCRCTACAAGCAGACCGTTAAGACTRCTTCTTAAAGCNGGAAGATACTCCGCCA

**EH038210** [189 – 470 bp]

AAATTAACCTTCGTTCACTCCTCAGTGTGTT**AGCAGCAGGTTTCCAATAACCC**TTGCCAATATCTC[T]TGTGCTTAGCCTCGTAG[**CT**]ATTGTCC  
AGTAGGGGGTTACATTTACTACAGTCCATGC[C/T]CAATATCATGACCTCCTCTCTGCTCTCTCAATTTCTGCCATCCATCCTAAGTTTC  
TCCAGGTTTAGCTTCTTCTTCCAAAGATGAGTTTTGCTCTCTGTTTTT[G/T]TTCATAG**ACTCCAACCTCTCTCTCA**ATTGAAGCTaCTAATTT

**DW475554** [168 – 389 bp]

AGGTGATGCTTTCTGTTGG**AGGCTTCTCTCACAGTTGG**TCTAGG[C/A]AAGGGCATTGAAGACTGCGTGAGGGCAGGTTGCTATGCCGCAACG  
TTATCATCCAGCGCCCGGCTGACTTACCCGGGAGAGCCTGACTTCAACTAGTGCAAA[-/A]CTGAGGCACGTCATGAGAGGACTGTTAT[A/C  
JGGCACT[**TA/-**]ATTGTTAACAGTGCCTGGTTCGGTGTCTA

**EH038215** [101 – 321 bp]

CCATCAT**TATATGTCGTAGAGCTTAGGAAATCCCA**[**CT**]GGAGACTCTA[C/T]GTTGTATAGACAG (**Intron**) CTGTGCGAAAGGCTCTCC**GATGAGC**  
**TAGGTGCCGTGCA**AGACAGACAGATCGCGAGGACTGAATCATCGAGTGCAGACCTCTCGAGCCTCGATGGCGAAGCGTTCCTCTATCTGGGTTT  
TGATCATATTGCTTTCCCTGTGTTGTTTTGGGAACAGGGG

**EH038217** [40 – 639 bp]

AAGTGGACATGANCATAGCTCGTGNATGGCGAAGGTTCCCTTGAGAAGACGAGACTGCAAAAGCTGTTCTCAAGAAAGAAAAATAGTAAGCCAA  
AGATAGATTCCAAGAAGAATGATGATTTAGCTAGTGAATAGAAGACAAGGAGCTTTATGTTGAACGCATACGCTTGAACAATGGATTAAAG  
CTTTGGGAATTTATTGGCAAGGTCAAAATCAAGAGCCTACANNNGAAGAGGTGATTGCTTTGATAGGAGAAAAAGTCCAAAGGGCCAGGAT  
GATAGGGCAATTCATGTAAGCACTTCAAAAATATCCCAATGGCAGACATGGAGTTGGTCTGCTGAGAAGAAAAACCCGAGCCTCACACCTA  
TGGACTGGGTTCAATTTATTGTTCTGTTGCTATTGGACTGTTACACTCATGTTCACTGGAAAT**GCCTAAAGCTGATTTCTGGG**TTGTAATTGC  
AATCCT[**G/C**]CTGCACCTGGCAGGATAITGGCGGAAGATCATTTCTGTTTCAACAGAATATGGCAACCTACCAAACTANTACACTCAATCAAT  
GTATGACAACAACACTAGATAGTGGGAAAGGCACA

**EH038211** [464 – 622 bp]

ACTACCAAT**ATTGAGCTAAATGATCTGCAGAACA**[**A/G**]AAATTCAGCA[T/G]CACAAG**GTTAAAGCTTCAGTTGAAGC**ATATAGAAATGAT  
AAAGCAGAAACAAGTTTGAATAAATGAAAGTTAGTGTGTAATTTACCCATATCTGCTTAAATCTCC

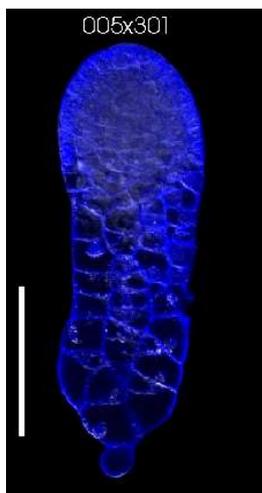
### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Vergleichende phänotypische Charakterisierung von Inzuchtlinien und F1-Hybriden

East stellte 1936 fest, dass Hybridembryonen und Hybridendosperm im Vergleich zu den Geweben der elterlichen Inzuchtlinien häufig im reifen Korn größer sind und dass diese Größenzunahme ein Phänomen von Heterosis ist. Um zu analysieren, ob eine verstärkte Hybridvitalität schon wenige Tage nach der Bestäubung von Mais messbar ist, wurden die Embryo- und Endospermlängen von Hybrid- und Inzuchtgenotypen, die sechs bzw. acht dap isoliert wurden, verglichen. Um den Vergleich der Embryo- und Endospermlängen auf eine breite Basis zu stellen, wurden zwei verschiedene interpool Kreuzungen der Genotypkombinationen UH301/UH005 und UH250/UH005 und eine intrapool Kreuzung der Inzuchtlinien UH301 und UH250 zu unterschiedlichen Zeitpunkten im Jahr untersucht.

##### 3.1.1 Embryo, sechs bzw. acht dap

Alle Genotypen der isolierten, sechs dap Embryonen befanden sich im Transitionsstadium, das der Keimblattbildung vorausgeht. Morphologisch waren zwei deutlich zu erkennende Bereiche der Embryonen unterscheidbar. Der Bereich, der dem eigentlichen Embryo zuzuordnen war, wies zytoplasmareiche, kleinere Zellen auf. Große, stark vakuolisierte Zellen waren im Bereich des Suspensor erkennbar. Histologisch konnten zu diesem Zeitpunkt in der Entwicklung protodermale Zellen von darunter liegenden Zellschichten im eigentlichen Embryo unterschieden werden, sichtbare Meristeme waren noch nicht differenziert (Abb.6).

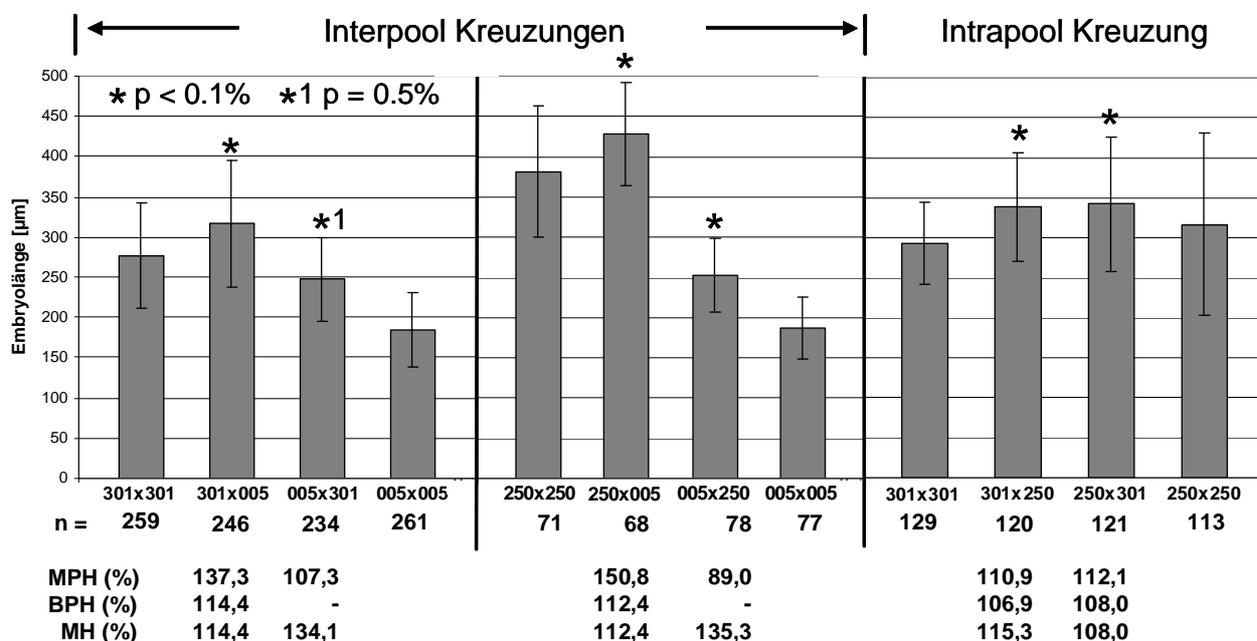


**Abbildung 6: Histologische Färbung eines sechs dap Hybridembryos**

Konfokale Mikroskopaufnahme eines sechs dap F1-Embryos des Genotyps 005x301, dessen Zellwände mit Calcofluor White gefärbt wurden; Der eigentliche Embryo und der Suspensor sind auf Grund der unterschiedlichen Zellgrößen deutlich voneinander zu unterscheiden. Die protodermale Zellschicht lässt sich als äußerste, von der inneren Zellmasse abgrenzende Zellschicht im eigentlichen Embryo erkennen. Der Maßstab gibt 100µm wieder.

Für den Genotypvergleich im Rahmen der interpool Kreuzung UH301/UH005 wurden an sechs Isolationsterminen im Zeitraum von Juni bis September 2004 und an drei Isolationstagen in der Zeitspanne von Mai bis Juli 2005 insgesamt zwischen 234 bis 261 Embryonen pro Genotyp vermessen. Der Vergleich der Genotypen, die aus der interpool Kreuzung UH250/UH005 hervorgingen, basierte auf 68 bis 78 Embryonen pro Genotyp, die an drei Tagen im Zeitraum von Mai bis Juni 2005 isoliert wurden. Dem intrapool Vergleich lagen 113 bis 129 Embryonen pro

Genotyp zu Grunde, die an zwei Tagen in der Zeitspanne von Juni und Juli 2004 sowie an drei Tagen im Zeitraum von April bis Mai 2005 isoliert wurden. Abbildung 7 stellt die Ergebnisse der phänotypischen Vergleiche zwischen F1-Hybrid- und Inzuchtembryonen der verschiedenen Kreuzungen dar.



**Abbildung 7: Heterosis in sechs dap Embryonen**

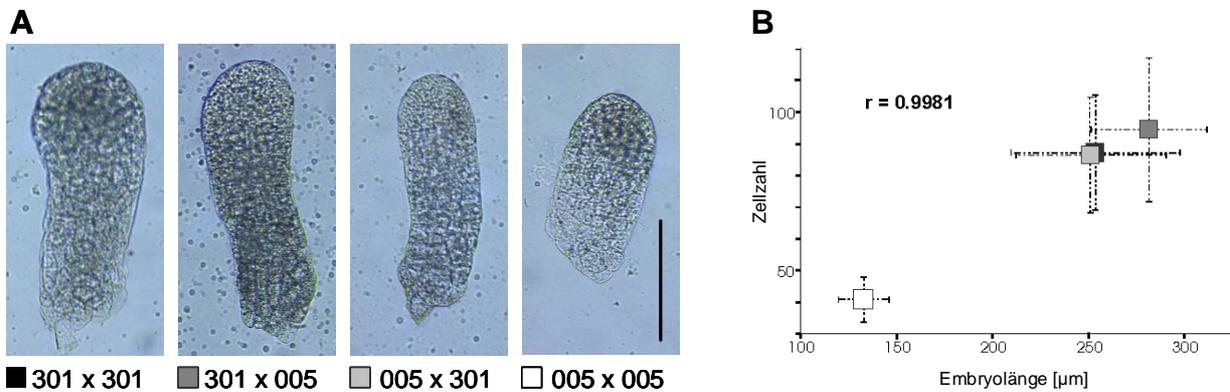
Vergleichende Übersicht über die durchschnittliche Länge von sechs dap Embryonen, die mit Hilfe von Mikrodissektionstechniken isoliert und lichtmikroskopisch vermessen wurden; Im linken und mittleren Abschnitt sind die Daten von F1-Hybrid- und Inzuchtembryonen der interpool Kreuzungen UH301/UH005 bzw. UH250/UH005 dargestellt, im rechten Abschnitt die der intrapool Kreuzung UH250/UH301. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen. Unterhalb der Säulendiagramme sind Angaben zum Genotyp, zur Anzahl (n) der vermessenen Embryonen und zu den prozentualen Werten für „Mid Parent Heterosis“ (MPH), „Best Parent Heterosis“ (BPH) und Maternal Heterosis (MH) zu finden. \* gibt den P-Wert von statistischen Analysen wieder, bei denen die Signifikanz des MPH-Wertes getestet wurde.

Die untersuchten Inzuchtgenotypen waren bezüglich der Embryolänge deutlich von einander zu unterscheiden. Für die Hartmaisinzuchtlinie UH005 konnte eine maximale Länge von 288µm gemessen werden. Die Zahnmaisinzuchtlinien UH250 und UH301 waren mit einer maximalen Länge von 572µm bzw. 450µm nicht nur zur Hartmaisinzuchtlinie sondern auch untereinander auffällig verschieden.

In der interpool Kreuzung der Linien UH301 und UH005 zeigten im Durchschnitt beide reziproke Hybriden im Vergleich zu dem Mittel der elterlichen Inzuchtlinien einen signifikanten Längenzuwachs (Abb. 8A). Der Längenzuwachs betrug für das Hybrid 301x005 maximal 151% im Vergleich zum Mittel der Eltern und war an jedem Isolationstag beständig messbar. Durch die Vermessungen des Hybrids 005x301 konnte ein maximaler Längenzuwachs von 180% im Vergleich zu der mütterlichen Inzuchtlinie UH005 nachgewiesen werden.

Tabelle 1 gibt einen exemplarischen Überblick über die Kenndaten von drei Isolationstagen. Die mit dem Längenzuwachs verbundene Hybridvitalität wurde in der Tabelle 1 und der Abbildung 7

mit Hilfe des MPH-Wertes  $((H-(P_1+P_2/2))/(P_1+P_2/2))*100+100$  erfasst, der die Größenzunahme im Vergleich zur mittleren elterlichen Größe aufzeigt. Der BPH-Wert  $((H-P_B)/P_B)*100+100$  wurde als Maß für die mögliche Überlegenheit der Hybriden gegenüber dem besten Elter genutzt. Der Zuwachs gegenüber der mütterlichen Inzuchtlinie wurde über den MH-Wert  $((H-P_M)/P_M)*100+100$  berechnet.



**Abbildung 8: Erhöhte Wachstumsrate in F1-Hybriden**

A) Durch Mikrodissektion isolierte Inzucht- und F1-Hybridembryonen der interpool Kreuzung UH301/UH005; Der Genotyp und die Farbkennzeichnung für Abbildung B) sind unterhalb der Einzelbilder angegeben. Der Maßstab gibt für alle Bilder 100µm wieder. B) Korrelation zwischen der Zellzahl und der Embryolänge der unter A) exemplarisch abgebildeten Inzucht- und Hybridembryonen. Im Diagramm wurde die durchschnittliche Zellzahl (Y-Achse) gegen die durchschnittliche Embryolänge (X-Achse) aufgetragen. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen. Mit Hilfe der PEARSON-Analyse wurde eine starke Korrelation ( $r=0,9981$ ) zwischen den Merkmalen nachgewiesen.

Die statistischen Analysen zeigten die Signifikanz des Längenzuwachses für beide Hybriden der interpool Kreuzung UH301/UH005 an allen drei Tagen der Isolation. Der MPH-Wert der untersuchten reziproken Hybriden unterschied sich allerdings auffallend, da die Größe der Hybridembryonen stets ausgehend von der Größe der mütterlichen Inzuchtlinie zunahm. Signifikante BPH-Werte zeigte nur das Hybrid 301x005, das auf der mütterlichen Inzuchtlinie UH301 beruht, die große Embryonen hervorbrachte.

**Tabelle 1: Kenndaten von drei unterschiedlichen Isolationstagen**

Isolation	Datentyp	Genotypen der interpool Kreuzung			
		301 x 301	301 x 005	005 x 301	005 x 005
08.06.2004	Länge (µm) / n / s	250.8 / 52 / 37.6	279.4 / 42 / 26.6	240.0 / 39 / 28.2	133.5 / 52 / 6.4
	MPH (%) / P-Wert		145.4 / 2.2e-16	124.9 / 8.6e-09	
	BPH (%) / P-Wert		111.4 / 4.4e-05		
16.06.2004	Länge (µm) / n / s	242.5 / 29 / 64.2	290.2 / 25 / 19.4	241.3 / 16 / 29.5	181.0 / 26 / 27.0
	MPH (%) / P-Wert		137.0 / 6.2e-13	111.0 / 0.0129	
	BPH (%) / P-Wert		119.6 / 0.0005		
06.07.2004	Länge (µm) / n / s	241.3 / 26 / 57.1	312.0 / 27 / 42.9	235.8 / 23 / 28.7	169.5 / 25 / 29.2
	MPH (%) / P-Wert		151.9 / 1.9e-13	114.8 / 0.0043	
	BPH (%) / P-Wert		129.3 / 6.6e-06		
Gesamt:	Länge (µm) / n / s	244.9 / 107 / 50.6	293.8 / 94 / 33.4	239.0 / 78 / 28.4	161.3 / 103 / 29.3
	MPH (%) / P-Wert		144.7 / 2.2e-16	117.7 / 1.14e-11	
	BPH (%) / P-Wert		120.0 / 1.60e-12		

Die Tabelle gibt Auskunft über die mittlere Embryolänge der vier untersuchten Genotypen der interpool Kreuzung UH301/UH005 an drei unterschiedlichen Isolationstagen und eine Zusammenfassung der Daten. Die P-Werte der für die MPH- und BPH-Werte durchgeführten statistischen Signifikanztests sind zusammen mit der Anzahl der vermessenen Embryonen (n) und der Standardabweichung (s) angegeben.

Bei den ebenfalls untersuchten inter- und intrapool Kreuzungen der Genotypkombinationen UH250/UH005 und UH250/UH301 war Heterosis an der Größenzunahme der F1-Hybride im Vergleich zur mütterlichen Inzuchtlinie auch signifikant detektierbar. Bei der intrapool Genotypkombination konnte ferner im Durchschnitt bei beiden reziproken Hybriden ein signifikanter Längenzuwachs zum Mittel der Eltern und zur Inzuchtlinie UH250, die die größten Embryonen aufwies, festgestellt werden. Im Rahmen der interpool Kreuzung UH250/UH005 zeigte das Hybrid 250x005 den höchsten durchschnittlichen Längenzuwachs der drei untersuchten Genotypkombinationen. Die Abbildung 7 gibt durch die Angabe der MPH-, BPH- und MH-Werte einen vergleichenden Überblick über die durch Kreuzung unterschiedlicher Inzuchtlinien erzeugte Hybridvitalität. Die Signifikanz der MPH-Werte wurde durch ein gemischtes Model ermittelt und ist im Diagramm vermerkt.

Die interpool Kreuzungen wiesen den höchsten mittleren MPH-Wert auf, wobei sich die Kreuzung UH301/UH005 deutlich von der Kreuzung UH250/UH005 absetzte. In der Genotypkombination UH250/UH005 zeigte zwar das 250x005 Hybrid mit einem MPH-Wert von 150,8 die am höchsten gemessene Heterosis, für das 005x250 Hybrid wurde jedoch eine mittlere Länge festgestellt, die unter dem Durchschnitt der Eltern lag. In der intrapool Kreuzung zeigten beide reziproken Hybride einen Längenzuwachs über das Maß der Eltern. Dieser Längenzuwachs war jedoch so gering, dass diese Genotypkombination sich im Mittel durch den kleinsten MPH- und MH-Wert auszeichnete. Die durch die Vermessung der intrapool Kreuzung der Zahnmaislinien erfasste Heterosis war folglich am geringsten.

In der Summe zeigten die Ergebnisse, dass Heterosis schon in der sehr frühen Embryogenese innerhalb verschiedener Genotypkombinationen und unabhängig von Variationen der äußeren Bedingungen, die bei der Isolation an unterschiedlichen Tagen im Jahr vorkommen können, über die Größe von Embryonen konstant detektierbar war und Einfluss auf die Embryonalentwicklung der F1-Hybriden nahm.

Um die Ursache für die signifikante Längenzunahme der sechs *dap* F1-Hybriden gegenüber den mütterlichen Inzuchtlinien ableiten zu können, sind im Rahmen dieser Arbeit histologische Untersuchungen an Inzucht- und reziproken F1-Hybridembryonen der interpool Kreuzung UH301/UH005 durchgeführt worden. Mit Hilfe eines konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops wurden Aufnahmen von Zellwand gefärbten Embryonen erstellt (Abb. 6), welche die Bestimmung der Zellzahl und Zellflächen sowie eine exakte Größenbestimmung in der mittleren Ebene der Embryonen ermöglichten (Tab. 2A).

Die histologischen Daten zeigten, dass eine erhöhte Wachstumsrate die Ursache für die Größenzunahmen der F1-Hybriden im Vergleich zur mütterlichen Inzuchtlinie war. Indizien dafür, dass eine durch Heterosis ausgelöste Expansion der Zellgröße der Grund für den Längenzuwachs der Hybriden war, wie es für Keimlingswurzeln von Mais F1-Hybriden beschrieben wurde (Hoecker *et al.*, 2005), konnten nicht gefunden werden. Da alle untersuchten Embryonen der verschiedenen Genotypen aus einer einzelligen Zygote hervorgegangen sind und unter den selben Wachstumsbedingungen sowie der selben Entwicklungszeit die Embryolänge und Zellzahl in allen vier Genotypen eine starke Korrelation zeigten (Abb. 8B), kann nur eine erhöhte Anzahl an Zellteilungen in Hybridembryonen den Heterosiseffekt erklären. Diese

Erkenntnis wurde durch das Fehlen von signifikanten Unterschieden der durchschnittlichen Zellfläche im Vergleich von Hybriden und mütterlichen Inzuchtlinien unterstützt (Tab. 2B).

**Tabelle 2: Histologische Untersuchung von sechs dap Embryonen und statistische Analyse**

**A**

Genotyp	Anzahl der Embryonen <sup>1</sup>	Mittlere Embryolänge	Standardabweichung Embryolänge	Mittlere Zellzahl	Standardabweichung Zellzahl	Mittlere Zellfläche	Standardabweichung Zellfläche
301x301	11	253,36	43,89	87,27	18,11	231,40	26,98
301x005	10	279,32	30,97	94,50	22,68	233,57	22,35
005x301	9	252,82	40,98	86,33	18,08	200,84	21,43
005x005	13	131,64	14,09	40,92	7,09	201,77	37,10

**B**

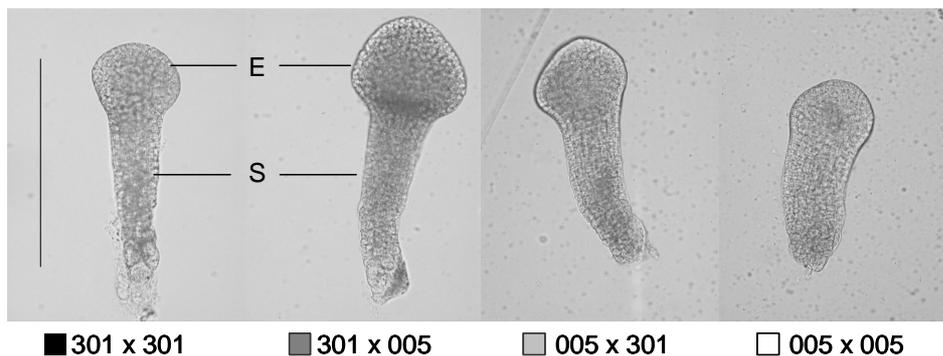
Genotyp 1 / Genotyp 2	301x301 / 301x005	301x301 / 005x301	005x005 / 301x005	005x005 / 005x301	301x005 / 005x301
mittlere Embryolänge	0,098	0,898	1,24E-09	2,46E-06	0,064
mittlere Zellfläche	0,843	0,011	0,034	0,941	0,005

A) Histologische Daten; Sechs dap Embryonen der interpool Kreuzung UH301/UH005 wurden über Mikrodissektion isoliert, fixiert, mit Calcofluor White gefärbt und mit Hilfe eines konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops und der zugehörigen Software untersucht. Die Tabelle gibt Aufschluss über die Anzahl der analysierten Embryonen pro Genotyp, die mittlere Embryolänge, die mittlere Zellzahl sowie die mittlere Zellfläche und deren Standardabweichungen. B) Statistische Analyse zum Vergleich der Embryolänge bzw. der Zellfläche zwischen den untersuchten Genotypen; Die Tabelle gibt die Testergebnisse der statistischen Analysen mittels zweiseitigem studentischen T-Test wieder.  $H_0$ : Genotyp1 = Genotyp2,  $P < 0,05$  zeigt signifikante Ungleichheit.

<sup>1</sup> Die Anzahl der Embryonen pro Genotyp war auf Grund der Analysetechnik begrenzt. Die über die Untersuchung gewonnenen Ergebnisse zur Embryogröße entsprechen den in Meyer *et al.*, 2007 publizierten. Dort wurden die gleichen Zusammenhänge zwischen Genotyp und Embryolänge im Rahmen von drei Einzelmessungen von insgesamt 382 Embryonen festgestellt.

Eine erhöhte Anzahl an Zellteilungen im selben Entwicklungszeitraum kennzeichnet eine schnellere Entwicklung. Phänotypische Analysen von acht dap Embryonen der interpool Genotypkombination UH301/UH005 machten die durch die Hybridvitalität vermittelte schnellere Entwicklung erkennbar.

In morphologischen Untersuchungen dieser Embryonen konnte gezeigt werden, dass F1-Hybridembryonen frühzeitiger als Inzuchtembryonen den phänotypischen Wandel vom keulenförmig, radiär-symmetrischen Proembryo hin zum Embryo mit adaxial/abaxialer Polarität beginnen. Der vergrößerte, asymmetrisch erscheinende eigentliche Embryo der Hybriden wies auf eine bereits eingesetzte Zellstreckung zur Anlage des Keimblattes auf der abaxialen Seite hin. Die Inzuchtlinien besaßen im Vergleich dazu eine symmetrische Gestalt und befanden sich in einem früheren Entwicklungsabschnitt innerhalb des Transitionsstadiums (Abb. 9).



**Abbildung 9: Entwicklungsunterschied zwischen 8 dap Embryonen der Hybride und parentalen Inzuchtlinien**  
 Acht dap F1-Hybridembryonen und Embryonen der parentalen Inzuchtlinien der interpool Kreuzung UH301/UH005, die mittels Mikrodisektion isoliert wurden, zeigten deutliche Unterschiede im Entwicklungsstand. Der vergrößerte, asymmetrisch erscheinende eigentliche Embryo verwies auf eine bereits eingesetzte Zellstreckung zur Anlage des Keimblattes auf der abaxialen Seite des Embryos. Diese Zellstreckung war bei Inzuchtembryonen nicht erkennbar. Der Genotyp ist unterhalb der Embryonen angegeben. E: eigentlicher Embryo, S: Suspensor, Maßstab: 500µm

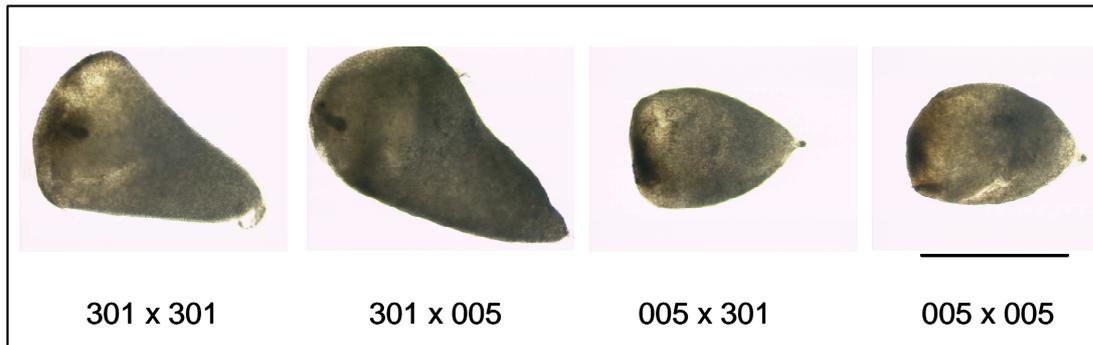
### 3.1.2 Endosperm, sechs dap

Die Endospermentwicklung ist von großem Interesse und Wichtigkeit sowohl in der Landwirtschaft als auch in der Biotechnologie und Grundlagenforschung (Olsen *et al.*, 1992; Clore *et al.*, 1996). Daher stellte sich die Frage, ob Heterosis sechs Tage nach der Bestäubung im Endosperm gleichermaßen wie im Embryo detektierbar ist und in diesem Gewebe ebenso starken Einfluss auf die Entwicklung der Hybridgewebe nimmt.

Zu diesem Zeitpunkt in der Entwicklung befanden sich die isolierten Endospermgewebe im Zellproliferations- und Differenzierungsprozess. Die Erfassung der Hybridvitalität wurde durch eine mikroskopische Größenmessung vorgenommen. Um einen direkten phänotypischen Vergleich zum analysierten Embryogewebe der F1-Hybrid- und Inzuchtgenotypen der interpool Kreuzungen UH250/UH005 und UH301/UH005 und der intrapool Kreuzung UH250/UH301 zu ermöglichen, wurde das Endosperm gemeinsam mit den zuvor beschriebenen Embryonen isoliert und vermessen. Eine Zusammenfassung der Untersuchungsergebnisse ist in Abbildung 11 gegeben.

Die Untersuchungen der Endospermlängen der Inzuchtlinien zeigten, dass die Zahnmaislinien UH301 und UH250 ein größeres Endospermgewebe entwickeln als die Hartmaislinie UH005. Während das Endosperm der Inzuchtlinien UH301 und UH250 eine recht ähnliche Länge von maximal 3180µm bzw. 2915µm aufwies, war das Endospermgewebe der Inzuchtlinie UH005 mit maximal 2120µm deutlich kleiner.

Auf der Basis der Vermessung von 205 bis 222 Einzelgeweben im Rahmen der interpool Kreuzung UH301/UH005 konnte festgestellt werden, dass die F1-Hybridendospermgewebe dieser Genotypkombination in der Größe nicht oder nur gering von den mütterlichen Inzuchtgeweben abwichen. Einen Überblick über die Verhältnisse der Endospermgrößen von Inzucht- und Hybridgewebe liefert die Abbildung 10.



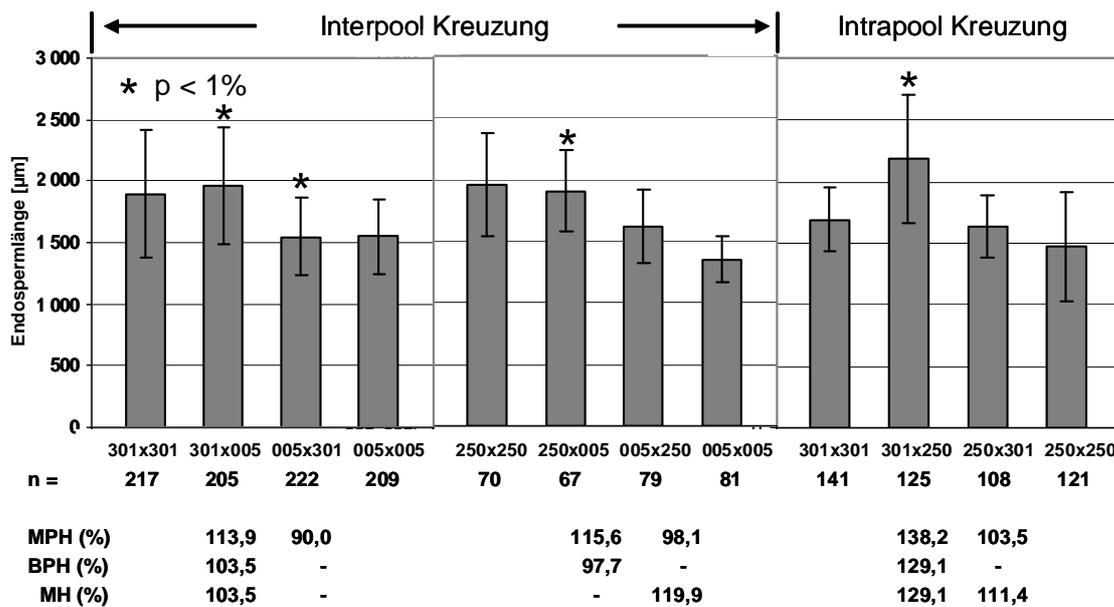
**Abbildung 10: Sechs dap Inzucht- und F1-Hybridendospermgewebe**

Überblick über die Größenverhältnisse von Inzucht- und F1-Hybridendospermgewebe, die aus der interpool Kreuzung UH301/UH005 hervorgegangen sind und sechs Tage nach der Bestäubung vom Nuzellusgewebe frei präpariert wurden; Der im Endosperm eingebettete Embryo hebt sich dunkel vom Endospermgewebe ab. Maßstab: 1500 $\mu$ m.

Beide reziproken Hybridendospermgewebe der interpool Kreuzung UH301/UH005 zeigten bei Vermessungen an verschiedenen Isolationstagen einen maximalen Längenzuwachs von bis zu 128,3% (301x005) bzw. 120,4% (005x301) im Vergleich zur mütterlichen Inzuchtlinie. Sie wiesen aber auch an vier bzw. sechs der neun Isolationstage Endospermgrößen auf, die im Mittel 9% kleiner waren als die der mütterlichen Gewebe. Im Durchschnitt war nur für das Hybridgewebe 301x005 ein Längenzuwachs zum Mittel beider Eltern feststellbar. Dieser Zuwachs betrug in Einzelmessungen maximal 137,1%. Das Endospermgewebe des reziproken Hybrids zeigte im Durchschnitt eine signifikant kleinere Größe als das Mittel der Eltern. Auf der Basis von statistischen Analysen war für das Hybridgewebe der interpool Kreuzung UH301/UH005 im Durchschnitt kein signifikanter Unterschied zur Endospermgröße der mütterlichen Inzuchtlinie feststellbar.

Für die interpool Genotypkombination UH250/UH005 wurden 67 bis 81 Gewebemessungen durchgeführt. Bei dieser Kreuzung konnte für das Hybridgewebe des Genotyps 250x005 kein signifikanter Unterschied zur Endospermgröße der mütterlichen Inzuchtlinie nachgewiesen werden. Dem gegenüber zeigten die statistischen Analysen, dass das Hybrid 005x250 zur mütterlichen Inzuchtlinie signifikant größer war. An den verschiedenen Isolationstagen betrug der Zuwachs bis zu 143%.

Auf der Basis der Vermessung von 108 bis 141 Einzelgeweben konnte für die intrapool Kreuzung UH301/UH250 gezeigt werden, dass beide reziproken Hybride in Hinblick auf die Größe des Endospermgewebes signifikant unterschiedlich zur mütterlichen Inzuchtlinie waren. Das Hybridendosperm 301x250 zeigte einen Längenzuwachs über dem Maß des besten Eltern. An den verschiedenen Isolationstagen betrug die Größenzunahme im Vergleich zum größten Elter bis zu 156,9%. Auch für das Hybridendosperm 250x301 konnte an 4 der 5 Isolationstagen eine Größenzunahme im Vergleich zum mütterlichen Inzuchtgewebe von bis zu 121,8% detektiert werden.



**Abbildung 11: Heterosis in sechs dap Endosperm**

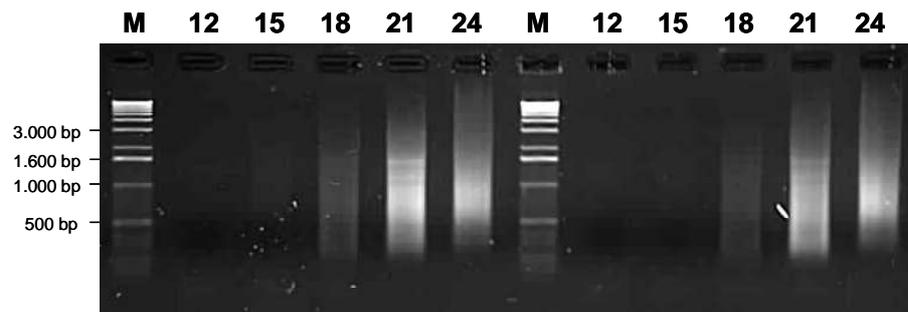
Vergleichende Übersicht über die mittlere Länge der sechs dap Endospermgewebe, die mit Hilfe von Mikrodissektionstechniken zeitgleich mit den analysierten Embryonen isoliert und Lichtmikroskopisch vermessen wurden; Im linken und mittleren Abschnitt sind die Daten von F1-Hybrid- und Inzuchtendospermgeweben der interpool Kreuzungen UH301/UH005 bzw. UH250/UH005 dargestellt, im rechten Abschnitt die Daten der intrapool Kreuzung UH250/UH301. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen. Unterhalb der Säulendiagramme sind Angaben zum Genotyp, zur Anzahl (n) der vermessenden Endospermgewebe und zu den prozentualen Werten für „Mid Parent Heterosis“ (MPH), „Best Parent Heterosis“ (BPH) und „Maternal Heterosis“ (MH) zu finden. \* gibt den *P*-Wert von statistischen Analysen wieder, die die Signifikanz des MPH-Wertes überprüften.

Die Zusammenfassung der morphologischen Daten in Abbildung 11 zeigt, dass Heterosis über das Merkmal Größe auch im Endosperm nachweisbar war, die Hybridvitalität jedoch im Mittel zu geringeren Größenzunahmen im Vergleich zur mütterlichen Inzuchtlinie führte als im Embryogewebe. Eine Tendenz zu maternalen Größenvorgaben war im Endosperm eindeutiger als im Embryo erkennbar. Trotz dieser Tendenz konnte in den untersuchten F1-Endospermgeweben Hybridvitalität festgestellt werden, was darauf verweist, dass Mechanismen, die zu Heterosis führen, auch im Endospermgewebe wirksam sind.

Für die interpool Kreuzung UH250/UH005 konnte festgestellt werden, dass die durch den MPH-Wert bestimmte Hybridvitalität im Embryogewebe der reziproken Hybriden sehr stark variierte. Daher wurde in den weiterführenden Arbeiten die interpool Genotypkombination UH301/UH005 untersucht, die im Embryogewebe bezüglich beider reziproker Hybride am stärksten Heterosis zeigte. Für molekulare Analysen mit dem Ziel der Identifikation von Heterosis assoziierter Genexpression wies das sechs dap Hybrid 301x005 dieser interpool Genotypkombination die besten Voraussetzungen auf. Es zeigte im Embryogewebe neben einem hohen MPH-Wert auch den höchsten BPH-Wert.

### 3.2 cDNA-Synthese aus limitiertem Probenmaterial

Durch die Untersuchung sehr früher Entwicklungsstadien wurde im Rahmen dieser Arbeit ausnahmslos mit sehr geringen Mengen an Probenmaterial gearbeitet. Um auf der Basis weniger Zellen molekulare Analysen durchführen zu können, erfolgte die cDNA-Synthese generell nach Le *et al.* (2005). Der Erhalt der relativen Transkriptmengen wurde durch die Kontrolle der Amplifikation sichergestellt (Abb. 12).



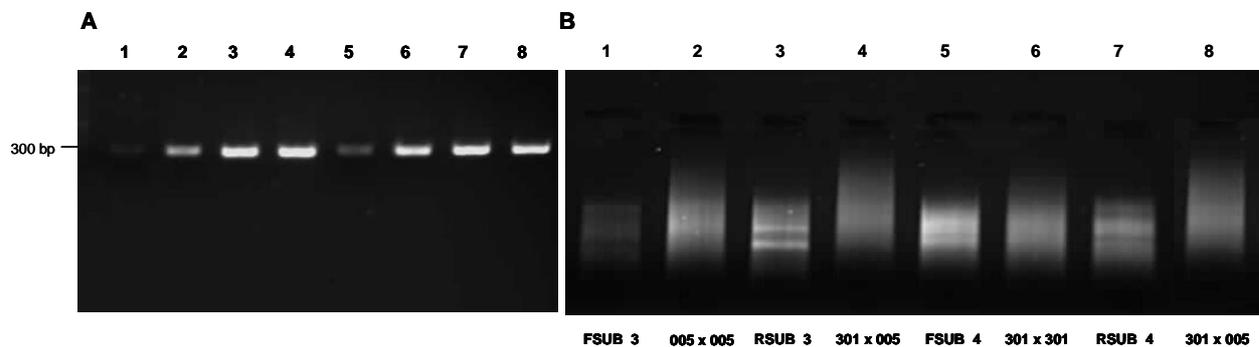
**Abbildung 12: Optimierung der Zyklenzahl zur Synthese repräsentativer cDNA**

Zur cDNA-Synthese wurde eine RT-Reaktion mit anschließender PCR durchgeführt. Um den Erhalt der relativen Transkriptmengen sicher zu stellen, erfolgte eine Optimierung der Zyklenzahl für jede PCR-Reaktion. Nach  $n+3$  Zyklen wurde zur Kontrolle der PCR-Reaktion von einem Probevolumen der PCR-Reaktion  $5\mu\text{l}$  entnommen und abgestoppt. Durch Vergleich der abgestoppten PCR-Proben mittels Gelelektrophorese (Angabe der Zyklenzahl oberhalb der Geltaschen) wurde die korrekte Zyklenzahl ermittelt. Spur 2-6 cDNA von 005x005 Embryonen; Spur 8-12 cDNA von 301x005 Embryonen; optimierte Zyklenzahl für beide Ansätze: 20; M: 100ng Größenstandard; 1,2 % Agarosegel.

### 3.3 Erzeugung subtrahierter cDNA-Banken

Als erster Schritt zur Identifizierung von differentiell exprimierten Genen zwischen elterlichen Inzuchtlinien und F1-Hybriden wurde eine suppressive subtraktive Hybridisierung (SSH) durchgeführt, um speziell angereicherte cDNA-Banken für sechs dap Embryo- und Endospermgewebe herzustellen. Zur Anreicherung der ausschließlich oder stärker exprimierten Gene eines Hybrids diente die cDNA der 301x005 Gewebe in je zwei getrennten Reaktionen als Tester, während cDNA der beiden Inzuchtlinien UH301 und UH005 jeweils separat als so genannte Driver eingesetzt wurden. Durch Subtraktionen dieser Art sind sowohl für Embryo- als auch für Endospermgewebe jeweils zwei angereicherte cDNA-Banken (301x005-301x301; 301x005-005x005) entstanden. Zusätzlich zu diesen Subtraktionen wurden zwei reverse Subtraktionen (301x301-301x005; 005x005-301x005) für jedes Gewebe durchgeführt, um cDNA-Populationen zu erhalten, die eine Anreicherung für vornehmlich oder ausschließlich in Inzuchtlinien exprimierten cDNAs zeigen. Um eine Abschätzung der Subtraktionseffizienz vornehmen zu können, wurde die Transkripthäufigkeit der Haushaltsgene *Ubiquitin* und *Glycerinaldehyd-phosphat-Dehydrogenase (gapdh)* in den cDNA-Populationen vor und nach der Subtraktion mittels PCR verglichen. Die Transkriptmenge dieser nicht differentiell exprimierten Gene war um das zwanzigfache für *gapdh* und um das zwanzig- bis vierzigfache für *Ubiquitin* in allen subtrahierten cDNA-Populationen verringert. Die Unterschiede zwischen subtrahierten und

unsubtrahierten cDNA-Populationen waren nach einer Agarosegelelektrophorese erkennbar (Abb. 13).



**Abbildung 13: Subtrahierte cDNA-Populationen**

A) Nachweis der Subtraktionseffizienz exemplarisch dargestellt; Bei Verwendung der unsubtrahierten cDNA-Population aus UH005 Embryonen in der *gapdh*-Test-PCR war nach 18 Zyklen ein Amplifikat zu erkennen, während bei Einsatz der subtrahierten cDNA-Population 301x005-005x005 erst nach 23 Zyklen das amplifizierte Fragment klar nachweisbar war. Spur 1-4: subtrahierte cDNA-Population, Spur 5-8: unsubtrahierte cDNA-Population. Es wurden jeweils 5µl PCR-Reaktion nach 18, 23, 28 und 33 Zyklen entnommen, abgestoppt und gelelektrophoretisch auf einem 2% Agarosegel dargestellt. B) Vergleich von subtrahierten und unsubtrahierten cDNA-Populationen mittels Agarosegelelektrophorese am Beispiel der cDNA-Populationen aus sechs dap Endosperm; Subtrahierte (Spur 1,3,5,7) und unsubtrahierte (Spur 2,4,6,8) cDNA-Populationen aus sechs dap Endospermgewebe der interpool Kreuzung UH301/UH005; FSUB3: 005x005-301x005, RSUB3: 301x005-005x005; FSUB4: 301x301-301x005; RSUB4: 301x005-301x301; 1,2 % Agarosegel.

Die subtrahierten cDNA-Populationen, die für ausschließlich oder stärker exprimierte cDNAs des F1-Hybriden 301x005 angereichert waren, wurden mittels T/A-Klonierung in den pGEM®-T Easy Vektor (Promega, Mannheim, D) eingebracht und in *Echerichia coli* transformiert. Individuelle Bakterienklone wurden kultiviert und Sonden für Microarrayanalysen über die Amplifikation der in den Vektoren inserierten cDNAs erzeugt.

### 3.4 Differentielles Screening subtrahierter cDNA-Banken aus sechs dap Embryonen

Um sechs dap erste Einblicke in die differentielle Expression zwischen Embryonen der elterlichen Inzuchtlinien und F1-Hybriden zu erlangen und die zwei subtrahierten cDNA-Banken (301x005-301x301; 301x005-005x005) aus Embryonen näher zu charakterisieren, wurde ein differentielles Screening nach Le *et al.* (2005) durchgeführt. Unter einem differentiellen Screening versteht man eine auf der Basis von Microarrayanalysen erfolgte Durchmusterung der eingesetzten cDNA-Banken nach differentiiell exprimierten Genen. Das durchgeführte differentielle Screening basierte auf je 380 nicht weiter charakterisierter cDNAs der subtrahierten cDNA-Banken (301x005-301x301 und 301x005-005x005). Für die Hybridisierungsreaktionen wurden die jeweiligen über die SSH-Prozedur subtrahierten cDNA-Populationen, die für Inzucht- bzw. Hybrid-cDNAs von Embryonen angereichert waren, und die nicht subtrahierten Ausgangspopulationen aus sechs dap Embryonen eingesetzt.

### 3.4.1 Identifikation von differentiell exprimierten Genen

Auf der Basis des differentiellen Screenings konnten Gene mit einer höheren Expression in Hybridembryonen und zu einem deutlich geringeren Ausmaß auch Gene, die in den Embryonen der parentalen Inzuchtlinien höher exprimiert waren, identifiziert werden. Die Tabelle 3 gibt einen Überblick über die Anzahl der Gene, die dem 99% Konfidenzniveau genügten und eine mehr als zweifach höhere Expression zeigten. Es konnte bei 8,7% bzw. 15,3% der subtrahierten cDNA-Banken eine mehr als zweifach differentielle Expression zwischen Inzucht- und Hybridembryonen festgestellt werden.

**Tabelle 3: Anzahl der differentiell exprimierten Gene des differentiellen Screenings**

Hybridisierung	Subtraktion	
	301x005-301x301	301x005-005x005
Unsubtrahierte cDNA (-/+)	41/11	15/1
Subtrahierte cDNA (-/+)	58/28	33/9

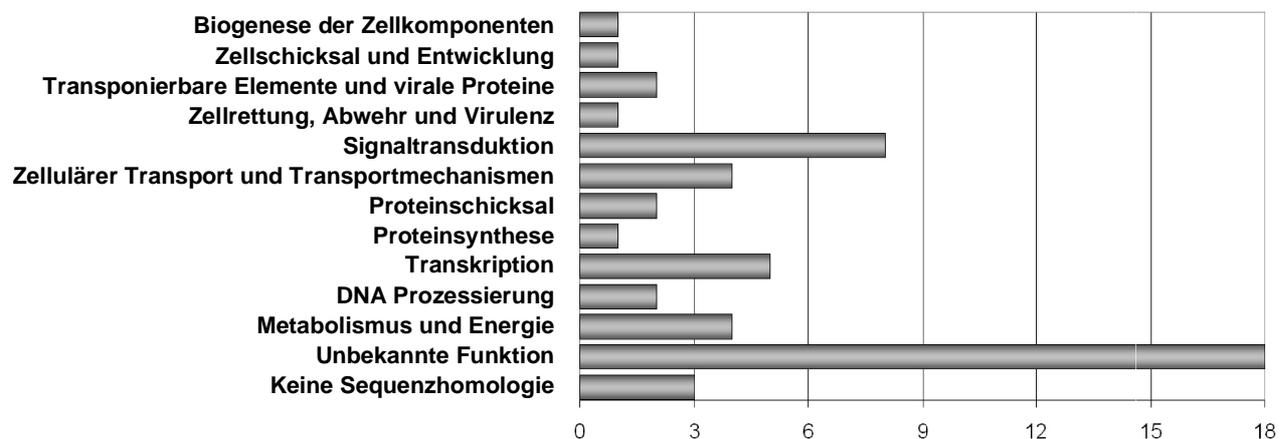
Insgesamt 760 subtrahierte cDNAs wurden mittels Microarrayanalysen untersucht, um Gene mit einer differentiellen Expression zwischen dem Hybridembryo 301x005 und dem Embryogewebe der elterlichen Linien UH301 und UH005 zu identifizieren. In der Tabelle ist die Anzahl der Gene aufgeführt, die sowohl dem 99% Konfidenzniveau genügten als auch zweifach differentiiell exprimiert waren. -/+ : höhere Expression im Hybriden / in der Inzuchtlinie.

Die statistische Analyse der Microarraydaten zeigte, dass 17% der Gene, die mit Hilfe der unsubtrahierten cDNA-Proben detektiert wurden, auch mit den subtrahierten cDNA-Populationen 301x005-301x301 und 301x301-301x005 identifiziert werden konnten. Bei der Verwendung der subtrahierten cDNA-Populationen 301x005-005x005 und 005x005-301x005 belief sich der Anteil auf 86%.

### 3.4.2 Sequenzanalyse und funktionelle Klassifikation

Auf der Grundlage des differentiellen Screenings wurden jeweils 30 der am stärksten differentiell exprimierten Gene der zwei Subtraktionen (301x005-301x301; 301x005-005x005) ausgewählt, wobei sich die ausgesuchten Gene durch das Erreichen des 99% Konfidenzniveaus in mindestens einem cDNA-Vergleich mit subtrahierten oder unsubtrahierten cDNA-Proben auszeichneten. Insgesamt wurden 49 cDNA-Klone mit einer höheren Expression in Hybridembryonen und 11 Klone mit erhöhter Expression in der jeweiligen Inzuchtlinie sequenziert. Die Untersuchung auf identische Sequenzen (Clusteranalyse) innerhalb der 60 sequenzierten cDNAs ergab, dass fünf cDNAs mehr als einmal vertreten waren. Von diesen cDNAs wurde jeweils die längste Sequenz für weitere Analysen verwendet. Das größte Cluster umfasste fünf cDNAs, das im Weiteren durch den Klon AH4 vertreten wird. Die restlichen vier Cluster beinhalteten jeweils zwei Sequenzen, die im Folgenden durch BC3, BE12, DB4 und GB10 repräsentiert sind. Auf Grund

der vorgefundenen Redundanz konnten 52 unterschiedliche cDNA-Sequenzen (86,7%) in die Suche nach Sequenzhomologien einbezogen werden. Diese erfolgte mit Hilfe des BLAST-Programmes (Altschul *et al.*, 1997), wobei nicht redundante öffentliche Sequenzdatenbanken und die Datenbank, die Transkriptsequenzen aller Spezies außer Maus und Mensch zusammenfasst, durchsucht wurden. Drei cDNA-Sequenzen zeigten bei jeder Datenbanksuche keinerlei Sequenzhomologie, wobei die Ausschlussgrenze für signifikant homologe Sequenzen  $e < 10^{-10}$  betrug. Das bedeutet, dass drei bislang unbekannte Gene identifiziert wurden. Sechs Gene zeigten keine Homologie zu bislang bekannten Proteinsequenzen, so dass sie keiner bestimmten funktionellen Kategorie zugeordnet werden konnten. Demgegenüber zeigten insgesamt 43 (83%) der differentiell exprimierten Gene hohe Homologien zu Datenbankeinträgen. 31 Sequenzen dieser Gruppe besaßen eine Homologie zu charakterisierten Proteinen. Auf der Grundlage von funktionellen Kategorien, die durch das Münchner Informationszentrum für *Arabidopsis* Proteinsequenzen (MIPS) etabliert wurden (Rudd *et al.*, 2003), konnten die untersuchten Sequenzen in 11 Kategorien eingeordnet werden. Aus der Abbildung 14 geht die Anzahl der Gene hervor, die bestimmten funktionellen Klassen zugeordnet werden konnten. Tabelle 4 gibt Aufschluss über die Homologien der einzelnen Gene, die Sequenzlänge der identifizierten cDNAs und die  $\log_2$ -Ratios des differentiellen Screenings mit subtrahierten und unsubtrahierten cDNA-Populationen.



**Abbildung 14: Funktionelle Klassifikation von differentiell exprimierten Genen des diff. Screenings**

Zwischen dem Embryogewebe des F1-Hybrids 301x005 und der parental Inzuchtlinien differentiell exprimierte Gene konnten auf der Basis von Sequenzhomologien (siehe Tabelle 4), die durch BlastX oder BlastN Analysen nachgewiesen wurden, in 11 funktionelle Klassen eingestuft werden.

Die funktionelle Klassifikation der im differentiellen Screening identifizierten, differentiell exprimierten Gene zeigte, dass die meisten Gene der Kategorie „Signaltransduktion“ zuzuordnen werden konnten. Diese Kategorie beinhaltet 25% der klassifizierbaren, differentiell exprimierten Gene. 12 weitere Gene (BD1, BE12, CB3, CG5, FB4, GB10, GB11, IC9, EF5, GF2, GF6, EG2) wiesen eine charakteristische Homologie zu Proteinen auf, die eine regulatorische Funktion wahrnehmen. Es handelte sich hierbei um 38% der klassifizierbaren Sequenzen, die auf Grund ihrer funktionellen Zugehörigkeit in verschiedene Kategorien, wie z.B. Transkription oder DNA Prozessierung, eingestuft wurden.

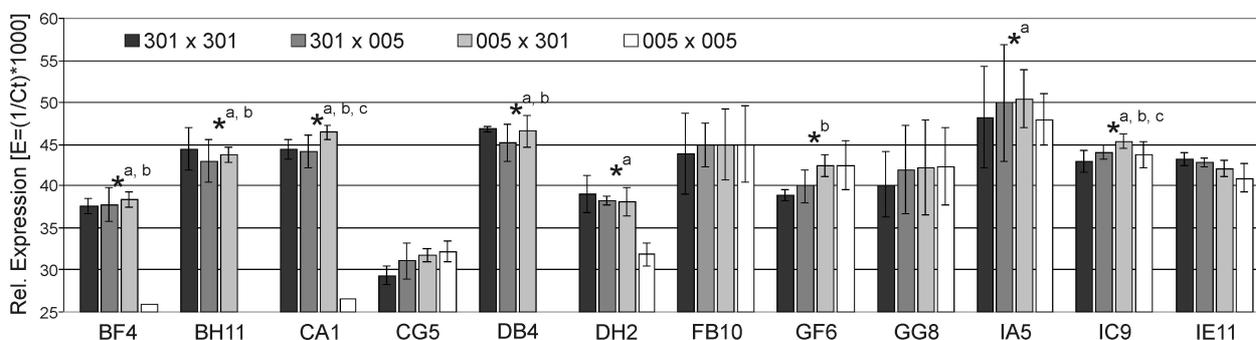
Tabelle 4: Identifizierte, differentiell exprimierte cDNAs des differentiellen Screenings

Klon	Länge [bp]	Ratio <sup>a</sup>	Datenbank -nummer	BlastX Sequenzhomologie (Datenbanknummer.)	E Wert
Subtraktion 301x005 – 005x005					
AE5	285	0,2/1,2*	EE297709	Gentranskript ohne bekannte Funktion	-
AF2	671	-0,3/-2,3*	EE297710	Putatives Ionenkanalprotein CASTOR [ <i>Zea mays</i> ] (ABD67492.1)	3e-118
AH4	754	-2,1*/-2,7*	EE297712	Putatives Protein eines transponierbaren Elementes [ <i>Oryza sativa</i> ] (ABA94904.1)	8e-65
BC3	537	-3,3*/-3,6*	EE297714	Bislang unbekannte Sequenz	-
BD1	643	-1,6/-2,3*	EE297715	(→DV536261.1) Putativer negativer Regulator von SAR [ <i>Oryza sativa</i> ] (XP_465213.1)	6e-30
BD2	721	-0,4/-2,4*	EE297716	Bislang unbekannte Sequenz	-
BD5	499	-1,4/-2,6*	EE297717	Copia ähnliches Retrotransposon Sto-1 [ <i>Zea mays</i> ] (BlastN, AF082127.1)	6e-136
BE12	762	-4,0*/-3,3*	EE297718	(→CO439827.1) Helikase ähnliches Protein [ <i>Oryza sativa</i> ] (BAD81690.1)	2e-18
BF4	702	-2,8*/-4,6*	EE297720	Oxidoreductase der Aldo/Keto Reductasefamilie [ <i>Oryza sativa</i> ] (ABB47623.1)	2e-99
BH11	363	-1,0/-2,9*	EE297721	Gentranskript ohne bekannte Funktion	-
CA1	336	-1,8*/-2,7*	EE297722	Gentranskript ohne bekannte Funktion	-
CA5	782	1,2*/-1,2	EE297722	Putatives Signaltransduktionsprotein [ <i>Oryza sativa</i> ] (NP_922139.1)	1e-106
CA6	766	0,2/1,9*	EE297738	Putative DegP2 Protease [ <i>Oryza sativa</i> ] (XP_467732.1)	1e-21
CB3	698	-0,4/-2,3*	EE297724	DNA bindendes Protein [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ] (NP_190446.1)	6e-47
CC6	632	0,3/1,2*	EE297727	Putative N2,N2-Dimethylguanidin tRNA Methyltransferase [ <i>O. sativa</i> ] (AAT75242.1)	2e-42
CE11	311	-0,3/1,6*	EE297728	mRNA der mitochondrialen ATP Synthase2 [ <i>Zea mays</i> ] (BlastN, X54233.1)	1e-145
CG5	472	0,6/3,1*	EE297729	Protein ähnlich einem transkriptionalen Co-Repressor [ <i>Oryza sativa</i> ] (XP_549869.1)	6e-14
CG8	210	0,5/4,3*	EE297730	Gentranskript ohne bekannte Funktion	-
CH9	377	0,6/1,9*	EE297731	Putatives Abscisinsäure induziertes Protein [ <i>Oryza sativa</i> ] (BAD37454.1)	8e-19
DB4	290	-1,8*/-2,6*	EE297732	Gentranskript ohne bekannte Funktion	-
DF11	788	-1,0/-3,9*	EE297735	Aldehydoxidase-2 [ <i>Zea mays</i> ] (BAA23227.1)	2e-120
DH2	740	-0,9/-3,1*	EE297736	Protein ähnlich der Proteinkinase MSK-3 [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ] (CAB87631.1)	2e-61
DH4	750	0,4/1,5*	EE297737	NADH abhängige Glutamatsynthase [ <i>Oryza sativa</i> ] (NP_916947.1)	8e-94
Subtraktion 301x005 – 301x301					
EC11	536	0,1/-4,2*	EE297739	"always early" Protein 3 [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ] (CAE47462.1)	8e-28
ED11	788	-0,1/-3,3*	EE297740	Unbekanntes Protein [ <i>Oryza sativa</i> ] (BAD73714.1)	9e-71
ED12	731	0,5/-3,2*	EE297741	AIR9 mit Proteinbindungsfunktion [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ] (NP_181015.3)	9e-66
EF5	510	-0,6/-2,9*	EE297743	Homolog zum Replikationslizenzierungsfaktor MCM7 [ <i>Zea mays</i> ] (CAC44902.1)	9e-47
EF11	583	-1,2/-2,7*	EE297742	Exprimiertes Protein DH12 [ <i>Zea mays</i> ] (AAU89121.1)	2e-87
EG1	785	-2,0/-2,9*	EE297744	Unbekanntes Protein [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ] (NP_201222.1)	8e-12
EG2	641	-2,0/-2,6*	EE297745	Protein ähnlich dem CLIP assoziiertem Protein [ <i>Oryza sativa</i> ] (XP_468395.1)	9e-23
EG3	601	-2,0/-3,2*	EE297746	Gentranskript ohne bekannte Funktion	-
EH11	454	-2,7/-3,1*	EE297747	Putatives Homolog zum "notchless" Protein [ <i>Oryza sativa</i> ] (NP_919493.1)	2e-82
FA7	343	-2,9/-2,7*	EE297748	(→CF628029.1) Protein "RADIAL SWELLING 3", Hydrolase [ <i>A. thaliana</i> ] (NP_201189)	2e-22
FB10	393	-1,9/-2,7*	EE297749	Unbekanntes Protein [ <i>Oryza sativa</i> ] (XP_469322.1)	5e-27
FB4	605	-1,2/-3,1*	EE297750	Putatives Polypyrimidin Pfad bindendes Protein [ <i>Oryza sativa</i> ] (AAV59307.1)	2e-76
FD6	601	2,8*/-1,2	EE297751	Calponin: Protein, das Kinesin- und Telomerbereiche bindet [ <i>Oryza sativa</i> ] (XP_472805.1)	8e-60
FE1	408	-3,0/-4,4*	EE297752	Unbekannte Sequenz	-
GB10	619	-3,8*/-3,7*	EE297753	Putative RNA Helikase [ <i>Oryza sativa</i> ] (BAD35820.1)	2e-92
GB11	705	-4,7*/-5,6*	EE297754	Protein ähnlich dem Protein mit PHD-Finger [ <i>Oryza sativa</i> ] (BAD35905.1)	4e-15
GF2	252	0,3/-4,4*	EE297755	Putatives Noc3p [ <i>Oryza sativa</i> ] (BAD45357.1)	9e-28
GF6	681	-1,0/-3,2*	EE297756	Putatives "nin one" bindendes Protein [ <i>Oryza sativa</i> ] (XP_463864.1)	4e-106
GG8	484	-0,1/-4,0*	EE297757	Protein ähnlich dem Vakuolensortierungsprotein [ <i>Oryza sativa</i> ] (ABA94940.1)	2e-61
GH9	507	-0,1/-3,4*	EE297758	Hypothetisches Protein [ <i>Oryza sativa</i> ] (NP_922615.1)	9e-71
HD10	528	-0,4/3,6*	EE297759	Putatives GTP bindendes Protein [ <i>Oryza sativa</i> ] (XP_450547.1)	6e-70
HG3	318	1,8/-3,0*	EE297760	Transportin [ <i>Oryza sativa</i> ] (CAC80069.1)	1e-15
HG6	290	-0,4/-3,7*	EE297761	Nucleotid bindendes Protein [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ] (NP_177513.2)	4e-40
HH3	692	0,5/-3,0*	EE297762	Hypothetisches Protein [ <i>Oryza sativa</i> ] (AAM46049.1)	2e-54
IA5	714	1,6/-3,2*	EE297763	Adenosinkinase [ <i>Zea mays</i> ] (CAB40376.1)	4e-133
IC2	425	-0,5/-2,8*	EE297765	Putative Protein mit "WD repeat" Bereich 5B [ <i>Oryza sativa</i> ] (BAD28241.1)	4e-52
IC9	452	-0,6/-3,6*	EE297766	Translationsinitiationsfaktor [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ] (NP_564845.1)	2e-45
ID12	527	-0,4/-3,2*	EE297767	Putatives Membranprotein [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ] (AAF63146.1)	4e-21
IE11	461	-0,3/3,7*	EE297768	Katalytische Proteinphosphatase Type 2C [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ] (NP_174731.1)	5e-57

<sup>a</sup> Log<sub>2</sub> transformierte Ratio der Fluoreszenzintensitäten der Microarrayanalyse mit subtrahierten bzw. unsubtrahierten cDNA-Banken; \* Diese Werte genügen dem 99% Konfidenzniveau. Negative Werte beschreiben eine höhere Expression im Hybriden 301x005. <sup>b</sup> Nutzung der BlastN Sequenzhomologie, wenn dies ausdrücklich beschrieben ist; Bei Nutzung einer hochgradig homologen Sequenz anstelle der Originalsequenz ist deren Datenbanknummer durch → gekennzeichnet.

### 3.4.3 Validierung der Expressionsmuster

Um die Expressionsprofile, die durch das differentielle Screening ermittelt wurden und jeweils den Vergleich zwischen den Embryonen des Genotyps 301x005 und einem der beiden elterlichen Genotypen umfassten, zu verifizieren, wurden quantitative RT-PCR (qRT-PCR) Analysen durchgeführt. Gleichzeitig dienten die qRT-PCR Analysen dazu, die relativen Expressionsniveaus zwischen den reziproken Hybriden und beiden elterlichen Inzuchtlinien aufzuzeigen. Insgesamt wurden 12 der differentiiell exprimierten Gene in diese Untersuchungen einbezogen, wobei 8 Gene (BF4, CG5, DH2, GG8, IA5, IC9 und IE11) auf der Basis ihrer Sequenzhomologie zu Genen mit regulatorischer Funktion ausgesucht wurden. Vier Gene wurden zufällig ausgewählt. Sie zeigten entweder keine Homologie zu Proteinsequenzen in den Datenbanken oder nur eine Homologie zu hypothetischen Proteinen. Zwei der insgesamt 12 Gene (CG5 und IE11) wiesen eine höhere Expression in Embryonen der Inzuchtlinie UH005 bzw. UH301 auf.



**Abbildung 15: Expressionsprofile von 12 differentiiell exprimierten Genen des differentiiellen Screenings**

Durch qRT-PCR Expressionsanalysen ermittelte Genexpressionsniveaus in sechs dap Embryonen der interpool Kreuzung 301/005; Gezeigt sind die normalisierten Mittelwerte und die Standardabweichungen. Die farbliche Kennzeichnung der Expressionsniveaus entspricht der Legende. Mit Hilfe des Vergleiches  $H_0:301x005=005x005$  wurde auf signifikante Expressionsunterschiede (\*<sup>a</sup>  $P \leq 0,02$ ) bei den Genen BF4-DH2 getestet, bei den Genen FB10-IE11 wurde der Vergleich  $H_0:301x005=301x301$  verwendet, um das differentielle Screening zu validieren. \*<sup>b</sup>  $P \leq 0,02$  kennzeichnet die signifikante Abweichung vom additiven Expressionsverhalten, wobei der Vergleich  $H_0:301x005=(301x301+005x005)/2$  oder  $H_0:005x301=(301x301+005x005)/2$  genutzt wurden. Signifikant überdominante Genexpression (\*<sup>c</sup>  $P \leq 0,1$ ) wurde für die Gene CA1 und IC9 mit Hilfe des Vergleiches  $H_0:005x301=301x301$  bzw.  $H_0:005x301=005x005$  festgestellt.

Unter Beachtung der Relation des mittleren Expressionsniveaus des Hybrids 301x005 und der jeweiligen elterlichen Inzuchtlinie, die zur Subtraktion genutzt wurde (UH005 bei den Klonen BF4, BH11, CA1, CG5, DB4 und DH2 bzw. UH301 bei den Klonen FB10, GF6, GG8, IA5, IC9 und IE11; siehe hierzu Tab. 4) konnte festgestellt werden, dass bei allen untersuchten Genen das auf der Basis des differentiiellen Screenings nachgewiesene Expressionsverhalten durch qRT-PCR Analysen verifizierbar war. Für sieben der 12 untersuchten Gene (58,3%) war dieser Hybrid-Inzucht-Unterschied auf der Basis der qRT-PCR Expressionsdaten hoch signifikant ( $P \leq 0,02$ ). Die Abbildung 15 zeigt die relativen Expressionsniveaus der 12 untersuchten Gene in den vier Genotypen, wobei die sieben signifikanten Hybrid-Inzucht-Unterschiede kenntlich gemacht sind. Des Weiteren sind signifikante Abweichungen der Hybridexpressionsniveaus vom

elterlichen Mittel bzw. die signifikant höhere Expression in Hybridembryonen im Vergleich zur höchst exprimierenden Elternlinie in der Abbildung 15 aufgezeigt.

Bei der Hälfte der analysierten Gene (CG5, DH2, FB10, GG8, IA5 und IE11) konnte ein additives Expressionsniveau in beiden reziproken Hybriden nachgewiesen werden, das nicht signifikant ( $P > 0,05$ ) vom elterlichen Mittel abwich. Bei vier Genen (BF4, BH11, CA1 und DB4) war ein dominantes Expressionsmuster feststellbar. Die Expression dieser Gene war in beiden reziproken Hybriden signifikant ( $P \leq 0,004$ ) gegenüber dem elterlichen Durchschnitt erhöht. Ferner zeigten diese vier Gene extreme Unterschiede in den Expressionsniveaus der elterlichen Genotypen. Bei den Genen BH11 und DB4 lag die Transkriptmenge des Genotyps UH005 unterhalb der Detektionsgrenze. Die UH005 Transkripte der Gene BF4 und CA1 konnten nur in einem der drei biologischen Replikate nachgewiesen werden.

Im Hybrid 005x301 wurde für die Gene GF6 und IC9 auf der Basis einer signifikanten ( $P \leq 0,03$ ) Abweichung vom elterlichen Mittel ein dominantes Expressionsverhalten festgestellt. Die Gene CA1 und IC9 wiesen ein überdominantes Expressionsmuster auf, da die Expression in einem der reziproken Hybride das Expressionsniveau des höchst exprimierenden Elter signifikant ( $P \leq 0,1$ ) überstieg.

### 3.5 Genexpressionsanalyse in sechs dap Embryo- und Endospermgewebe

Detaillierte Informationen über die veränderte Genexpression in F1-Hybriden ermöglichen die Antwort darauf, welchen Umfang genregulatorische Interaktionen in heterozygoten Individuen besitzen. Zugleich schaffen Einblicke in die veränderte Genexpression die Basis für das Verständnis der komplexen molekularen Mechanismen, die dem genetischen Phänomen Heterosis zu Grunde liegen.

Um möglichst weitreichende Erkenntnisse zur Genexpression in sechs dap F1-Hybriden im Vergleich zu den elterlichen Inzuchtlinien zu erhalten, wurde mit Hilfe eines speziellen, thematisch fokussierten Microarrays das Embryo- und Endospermgewebe der interpool Genotypkombination UH301/UH005 und der intrapool Genotypkombination UH250/UH301 untersucht. Microarrayanalysen ermöglichen den genauen Vergleich zweier cDNA-Populationen auf einem Objektträger durch Bindung der unterschiedlich Farbstoff markierten cDNA-Populationen an DNA-Sonden, die auf den Objektträger gedruckt sind. Der Nachweis unterschiedlicher Transkriptmengen ist durch diese Technik möglich.

Das Ziel der durchgeführten Analysen war, Heterosis assoziierte Genexpression nachzuweisen und identifizierte, differentiell exprimierte Gene beider Gewebe (Embryo, Endosperm) und Genotypkombinationen zu vergleichen und Gemeinsamkeiten sowie Unterschiede festzustellen.

#### 3.5.1 Produktion und Hybridisierung eines thematisch fokussiertem Microarrays

Für eine erweiterte Untersuchung der Heterosis assoziierten Genexpression wurde das thematisch fokussierte so genannte Heterosis-3k-Array produziert. Es umfasste cDNA-Populationen der frühen Entwicklung und Genfragmente von Chromatin assoziierten Proteinen sowie Genfragmente aus Mais, die von Kooperationspartnern zur Verfügung gestellt wurden.

Subtrahierte cDNA-Banken, die für ausschließlich oder stärker exprimierte cDNAs in sechs das F1-Hybriden angereichert wurden (Kapitel 3.3), stellten die Hauptkomponente des Arrays dar. 760 der 1885 für das Heterosis-3k-Array verwendeten cDNAs wurden bereits in dem vorausgegangenen differentiellen Screening eingesetzt. 1125 cDNAs wurden auf der Basis der vier subtrahierten Banken aus sechs das Embryo- und Endospermgewebe speziell für das Array hergestellt. Im differentiellen Screening wurde auf der Grundlage der Sequenzierung von 60 identifizierten, differentiell exprimierten Genen eine Redundanz von 13,3% für die subtrahierten cDNA-Banken aus Embryogewebe festgestellt. Ausgehend von der Annahme, dass die cDNA-Banken des Endospermgewebes die gleiche Redundanz aufweisen würden, konnte abgeleitet werden, dass die eingesetzten 1885 cDNA-Klone aus sechs das Embryo- und Endospermgewebe ungefähr 1634 einzigartige Gene repräsentierten.

Den zahlenmäßig zweitgrößten Anteil am Heterosis-3k-Array hatten Eizell- und Zentralzellbanken mit 868 verwendeten cDNA-Klonen, die aktive Gene oder gespeicherte Transkripte des jeweiligen weiblichen Gametentyps darstellten. Es wurden insgesamt 795 Zentralzellklone und 73 Klone aus subtrahierten Banken (Le *et al.*, 2005), die in Hinblick auf die Transkriptzusammensetzung in weiblichen Gameten entweder für cDNAs höher oder ausschließlich in Zentralzelle (40 Klone) oder Eizelle (33 Klone) angereichert waren, integriert. In durchgeführten Clusteranalysen konnte eine Redundanz von 19,4% innerhalb der nicht angereicherten Zentralzellklone ermittelt werden (persönliche Mitteilung von S. Scholten), so dass im Ganzen 714 einzigartige Sequenzen von Genen, die vor der Befruchtung im jeweiligen Gametentyp exprimiert werden, auf dem Array vorlagen.

Die drittgrößte Komponente des Heterosis-3k-Arrays setzte sich aus Genfragmenten aller bekannten Chromatin assoziierten Proteine aus Mais, die 2003 durch J. F. Gutiérrez-Marcos (Universität Oxford, GB) zur Verfügung gestellt wurden, zusammen. Es handelte sich hierbei um 168 Gene (Kapitel 7.2: Tab. 19), deren Identität und Sequenz in der Datenbank für Chromatin assoziierte Proteine ([www.chromdb.org](http://www.chromdb.org)) nachschlagbar sind. Die Expressionsanalyse von Chromatingenen macht konkrete Aussagen über die Beteiligung dieser Genklasse an Heterosis assoziierter Genexpression möglich.

133 cDNAs und Genfragmente, die durch Kooperationspartner zur Verfügung gestellt worden waren, wurden ebenfalls in das Heterosis-3k-Array integriert. Hierzu gehörten 113 Klone, die durch Analysen des Ein- und Zweizellstadiums in Mais identifiziert wurden (Okamoto *et al.*, 2005), 13 Retrotransposons (Kapitel 7.2: Tab. 19) (J. F. Gutiérrez-Marcos, Universität Oxford, GB) und sieben speziell ausgewählte Gene (Kapitel 7.2: Tab. 19), die von der AG Prof. Dr. Geiger (Universität Hohenheim, D) im Rahmen der Heterosis Forschung eingesetzt werden.

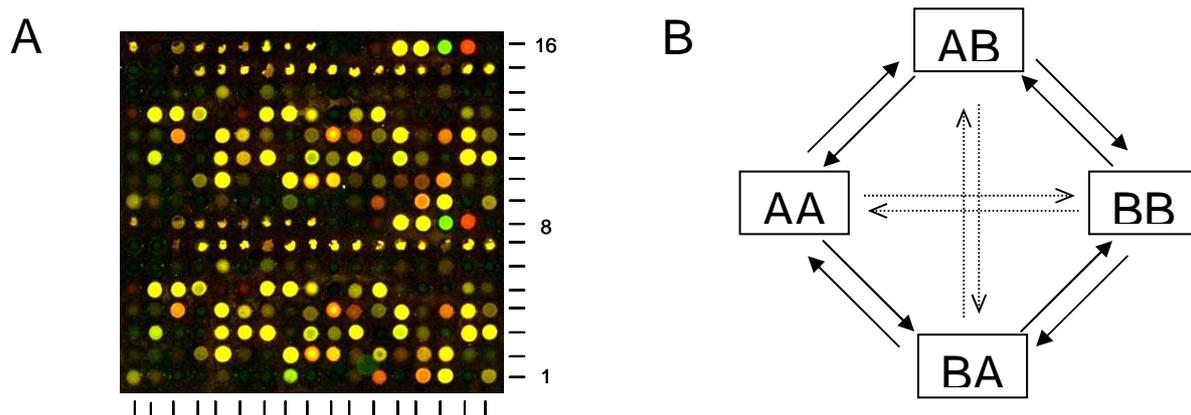
Durch die Integration der vier Microarraykontrollfragmente und der vier Genfragmente von putativ konstitutiv exprimierten Genen in Mais (*Aktin*, *rubisco* (*Ribulose-1,5bisphosphat-Carboxylase*), *gapdh* und *Ubiquitin*) konnten ferner die Analysen mit dem Heterosis-3k-Array kontrolliert und die statistische Datenauswertung unterstützt werden. Die Tabelle 5 zeigt die Zusammensetzung des Heterosis-3k-Arrays.

Das Heterosis-3k-Array wurde so entworfen, dass die insgesamt 3062 cDNAs in 32 Blöcken a 16x17 Spotts organisiert waren, wobei in den Reihen 9-16 jedes Blocks eine Wiederholung der in Reihe 1-8 gedruckten cDNAs und Genfragmente vorgenommen wurde und jeder Block

mindestens 8 Spots von Microarraykontrollfragmenten aufwies. Durch dieses Arraydesign wurde erreicht, dass jede cDNA zweifach auf dem Heterosis-3k-Arrays vorlag und sich in direkter Nähe zu Microarraykontrollen befand. Abbildung 16A zeigt einen Block des Heterosis-3k-Arrays nach der Hybridisierung mit Farbstoff markierten Sonden.

**Tabelle 5: Zusammensetzung des Heterosis-3k-Arrays**

Anzahl der Genfragmente	Beschreibung und Herkunft
947	sechs dap Embryonen (SSH: 301x005–005x005, 301x005–301x301, Meyer <i>et al.</i> , 2007)
938	sechs dap Endosperm (SSH: 301x005–005x005, 301x005–301x301)
868	Eizelle und Zentralzelle (Le <i>et al.</i> , 2005)
168	Gene von Chromatin modifizierenden Proteinen (www.chromdb.org)
8	Microarraykontrollen und Kontrollgene
133	Gene, die von Kooperationspartnern zur Verfügung gestellt wurden
3062	Gesamtanzahl der Klone und Genfragmente
Ca. 2649	Einzigartige Gensequenzen (unter Berücksichtigung der Redundanz)



**Abbildung 16: Heterosis-3k-Array-Design und das verwendete Schema zur Arrayhybridisierung**

A) Ein Block des Heterosis-3k-Arrays nach der Hybridisierung mit Farbstoff markierten cDNA-Populationen von sechs dap F1-Hybrid- und Inzuchtembryonen; Das 16x17 Blockdesign, die Wiederholung (Reihe 9-16) innerhalb des Blocks und die Microarraykontrollen in Reihe 8 und 16 (rechts außen, Färbung: gelb, gelb, grün, rot) sind zu erkennen. B) Schema der Hybridisierungen mit dem Heterosis-3k-Array; Durchgezogene Pfeile kennzeichnen Vergleiche, die über Microarrayanalysen ausgeführt wurden. Gepunktete Pfeile stehen für indirekte Vergleiche, die bioinformatisch ermittelbar waren. Doppelte Pfeile: Farbstoffwechsel bei der cDNA-Markierung; AA: Inzuchtlinie 1, BB: Inzuchtlinie 2, AB bzw. BA: reziproke F1-Hybride

Um einen möglichst weitreichenden und genauen Einblick in die differentielle Genexpression zwischen F1-Hybriden und elterlichen Inzuchtlinien für sechs dap Embryo- und Endospermgewebe zu erhalten, wurden insgesamt 56 Microarrayhybridisierungen mit dem Heterosis-3k-Array unter Verwendung zweier Genotypkombinationen durchgeführt. Die intrapool Genotypkombination UH250/UH301 wurde mit drei biologischen Replikaten untersucht. Die Vergleiche der interpool Genotypkombination UH301/UH005 basieren auf vier biologischen Wiederholungen. Die Hybridisierungen mit dem Heterosis-3k-Array erfolgten nach

dem gezeigten Hybridisierungsschema (Abb. 16B) im so genannten loop-Design. Das kreisförmige Design ermöglichte indirekte Vergleiche der relativen Transkriptniveaus mit hoher Genauigkeit. Um negativen Einfluss von Farbstoffeffekten zu vermeiden, wurden die zu untersuchenden cDNA-Populationen mit zwei Farbstoffen im Wechsel markiert. Die Tabelle 6 zeigt beispielhaft die für Embryogewebe der interpool Genotypkombination UH301/UH005 durchgeführten, direkten Vergleiche.

**Tabelle 6: Auf der Basis von Microarrayhybridisierungen durchgeführte, direkte Vergleiche**

Genotypvergleich	Biol. Replikate	Genotyp 1	Farbstoff	Genotyp 2	Farbstoff
301x301 / 301x005	1	301x301	Cy3	301x005	Cy5
	2	301x301	Cy5	301x005	Cy3
	3	301x301	Cy3	301x005	Cy5
	4	301x301	Cy5	301x005	Cy3
005x005 / 301x005	1	005x005	Cy3	301x005	Cy5
	2	005x005	Cy5	301x005	Cy3
	3	005x005	Cy3	301x005	Cy5
	4	005x005	Cy5	301x005	Cy3
301x301 / 005x301	1	301x301	Cy3	005x301	Cy5
	2	301x301	Cy5	005x301	Cy3
	3	301x301	Cy3	005x301	Cy5
	4	301x301	Cy5	005x301	Cy3
005x005 / 005x301	1	005x005	Cy3	005x301	Cy5
	2	005x005	Cy5	005x301	Cy3
	3	005x005	Cy3	005x301	Cy5
	4	005x005	Cy5	005x301	Cy3

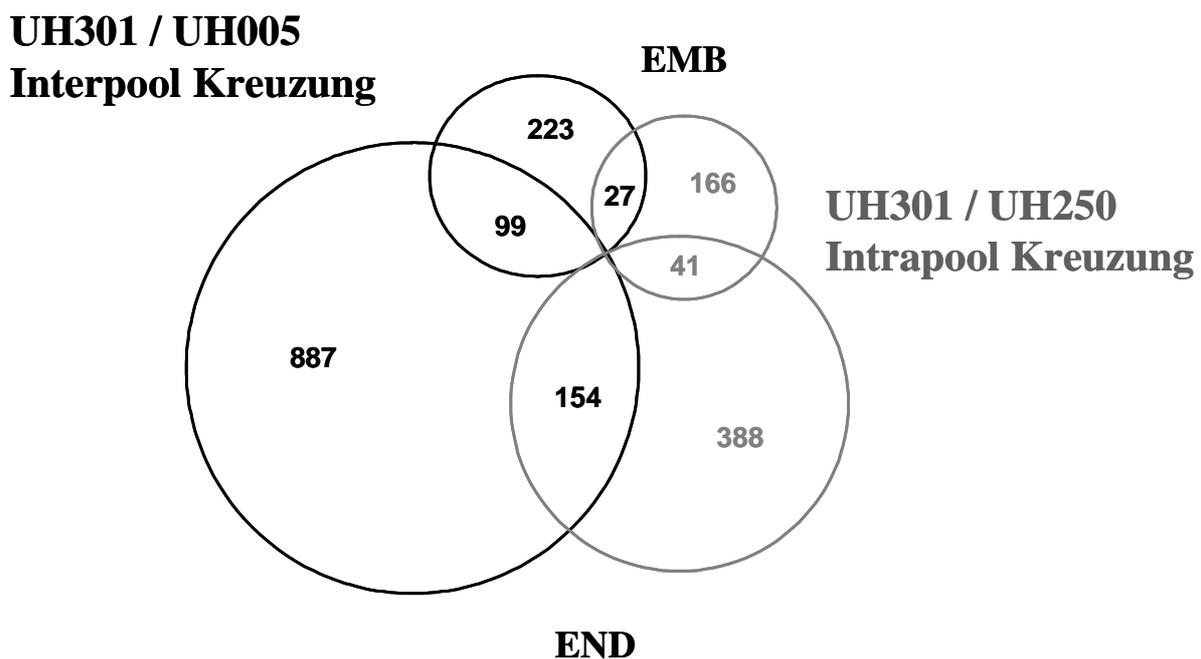
Gezeigt sind die für Embryogewebe der interpool Genotypkombination UH301/UH005 durchgeführten Hybridisierungen. Probenmaterial, das am selben Tag isoliert wurde, ist durch die gleiche Zahl in der Spalte „Biol. Replikate“ kenntlich gemacht.

Zur unabhängigen Überprüfung der Microarrayergebnisse wurde qRT-PCR eingesetzt. Es wurden insgesamt 31 Gene, die auf der Basis der Microarrayanalysen mit dem Heterosis-3k-Array einen Expressionsunterschied zwischen den untersuchten Genotypen in sechs dap Embryogewebe der interpool Genotypkombination UH301/UH005 zeigten, untersucht. 58 der insgesamt 77 über Microarrayanalysen ( $P \leq 0,1$ ) ermittelten Unterschiede zwischen der Genexpression der Genotypen konnten verifiziert werden. Bei 20 Genen waren alle über Mikroarrayanalysen detektierten Unterschiede validierbar, bei 6 Genen ein Teil. Insgesamt entspricht dies einer Rate von 75,3%.

### 3.5.2 Heterosis assoziierte Genexpression in sechs dap Embryo- und Endospermgewebe

Zahlreiche Gene konnten in den Vergleichen von sechs dap F1-Hybridgeweben mit den Geweben der elterlichen Inzuchtlinien bzw. der Inzuchtgeweben oder der F1-Hybridgeweben untereinander als differentiell exprimiert identifiziert werden (Tab. 7). Von den untersuchten 3062 Genfragmenten des Heterosis-3k-Arrays zeigten 166 bis 887 cDNAs einen signifikanten Expressionsunterschied ( $P \leq 0,05$ ) zwischen den Genotypen bei der Analyse des sechs dap

Embryo- bzw. Endospermgewebes der Genotypkombinationen UH301/UH005 und UH250/UH301. Für die Gewebe der intrapool Genotypkombination UH250/UH301 konnten insgesamt weniger Unterschiede in der Genexpression zwischen den F1-Hybrid- und Inzuchtgenotypen nachgewiesen werden. Ein Vergleich der identifizierten, signifikant differentiell exprimierten Gene beider Genotypkombinationen und untersuchten Gewebe zeigte, dass Gemeinsamkeiten bezüglich der differentiellen Genexpression bestanden. Abbildung 17 gibt eine Übersicht über die Anzahl der differentiell exprimierten Gene, die in zwei verschiedenen Geweben oder Genotypkombinationen gleichermaßen detektiert wurden. Gleichzeitig ist die Gesamtanzahl der identifizierten, differentiell exprimierten Gene für die untersuchten Gewebe dargestellt.



**Abbildung 17: Differentielle Genexpression in den verschiedenen Genotypkombinationen und Geweben**

Gegeben ist die Anzahl der Gene, die eine signifikant ( $P \leq 0,05$ ) differentielle Expression in mindestens einem Genotypvergleich in den verschiedenen Geweben der Genotypkombinationen UH301/UH005 und UH250/UH301 zeigten. Die Schnittmengen weisen auf die Anzahl der Gene hin, die in verschiedenen Genotypkombinationen oder Geweben gleichermaßen als signifikant ( $P \leq 0,05$ ) differentiiell exprimiert detektiert wurden.

Der zahlenmäßig größte Anteil der differentiell exprimierten Gene beider untersuchten Gewebe und Genotypkombinationen wurde auf der Basis der subtrahierten cDNA-Banken aus sechs dap Embryo- und Endospermgewebe detektiert. Identifizierte, differentiell exprimierte cDNAs, die den Eizell- und Zentralzellbanken zuzuordnen waren, machten bei Endosperm der interpool Kreuzung UH301/UH005 insgesamt einen Anteil von 35,6%, bei Embryogewebe einen Anteil von 18,8% aus. Bei der intrapool Genotypkombination UH250/UH301 gingen in der Summe 32,2% bzw. 34,5% der identifizierten cDNAs mit differentieller Expression in Endosperm- bzw. Embryogewebe auf die Eizell- und Zentralzellbanken zurück. Auf der Grundlage der 168 im Heterosis-3k-Array integrierten Genfragmente von Chromatin assoziierten Proteinen konnten differentiell exprimierte Gene dieser Genklasse identifiziert werden. Der Anteil dieser Gene an den insgesamt als differentiell detektierten Genfragmenten war in den beiden Geweben und

Genotypkombinationen verschieden. In der interpool Genotypkombination UH301/UH005 war für Embryogewebe ein Anteil von 5,8%, für Endospermgewebe ein Anteil von 3,3% feststellbar. Bei der intrapool Genotypkombination UH250/UH301 war der Anteil leicht erhöht. Er belief sich bei Embryogewebe auf 7,3%, bei Endospermgewebe auf 8,8%.

Tabelle 7 gibt einen Überblick über die Anzahl der identifizierten, differentiell exprimierten Genfragmente in den verschiedenen Genotypvergleichen insgesamt bzw. aufgeschlüsselt nach dem Ursprung der cDNAs (Eizell- und Zentralzellbanken, subtrahierte Embryo- und Endospermbanken, Chromatingene).

**Tabelle 7: Übersicht über die differentielle Genexpression in sechs dap Embryo- und Endospermgewebe**

A) Interpool Genotypkombination UH301/UH005

Art des Vergleiches	Vergleich	Embryo				Endosperm			
		Gesamt	Eizell und Zentralzell Banken	Subtrahierte EMB + END Banken	Chromatingene	Gesamt	Eizell und Zentralzell Banken	Subtrahierte EMB + END Banken	Chromatingene
Inzucht-Hybrid	005x005 vs 005x301	34	4	28	1	56	10	44	1
	005x005 vs 301x005	63	15	35	11	591	195	357	23
	005x301 vs 301x301	84	20	58	2	514	163	332	7
	301x005 vs 301x301	10	1	8	0	38	12	17	6
	Zusammenfassung	157	34	103	12	827	296	479	28
Hybrid	005x301 vs 301x005	0	0	0	0	154	21	127	1
Eltern	005x005 vs 301x301	133	22	103	3	549	181	345	12
Gesamt		223	42	160	12	887	316	516	29

B) Intrapool Genotypkombination UH250/UH301

Art des Vergleiches	Vergleich	Embryo				Endosperm			
		Gesamt	Eizell und Zentralzell Banken	Subtrahierte EMB + END Banken	Chromatingene	Gesamt	Eizell und Zentralzell Banken	Subtrahierte EMB + END Banken	Chromatingene
Inzucht-Hybrid	250x250 vs 250x301	17	5	9	2	83	25	47	5
	250x250 vs 301x250	121	45	64	9	211	68	115	17
	250x301 vs 301x301	16	7	5	2	83	33	40	8
	301x250 vs 301x301	53	18	28	5	3	1	1	0
	Zusammenfassung	148	54	78	11	277	94	141	27
Hybrid	250x301 vs 301x250	53	18	25	8	0	0	0	0
Eltern	250x250 vs 301x301	19	5	13	0	284	86	171	20
Gesamt		165	57	90	12	388	125	213	34

Anzahl der cDNAs mit signifikant ( $P \leq 0,05$ ) differentieller Expression in den untersuchten Geweben der A) interpool Genotypkombination UH301/UH005 und B) intrapool Genotypkombination UH250/UH301; Für jeden Genotypvergleich ist die Anzahl der detektierten cDNAs insgesamt und entsprechen dem Ursprung der Genfragmente aufgeschlüsselt gegeben.

Eine Überprüfung aller Inzucht-Hybrid-Vergleiche in Hinblick auf identifizierte, differentiell exprimierte Gene zeigte, dass es bestimmte Gene gibt, die in mehreren, unabhängigen Vergleichen gleichermaßen detektiert wurden (Kapitel 7.3: Tab. 20, Tab. 21).

Für Embryogewebe der interpool Genotypkombination UH301/UH005 konnte ein Gen (JC1) in allen vier Inzucht-Hybrid-Vergleichen und neun Gene (AB5, AH1, CD3, EC1, FE11, LG10, MC1, NG5 und CC0063) in drei der vier Vergleiche detektiert werden. Für Embryogewebe der intrapool Genotypkombination UH250/UH301 wurden drei Gene (AB5, *cha116* und UH5) in allen vier Vergleichen, und vier Gene (CE8, DH12, RG5 und *gln4*) in drei der vier Inzucht-Hybrid-Vergleiche nachgewiesen. Die Überprüfung der Inzucht-Hybrid-Vergleiche für Endospermgewebe der interpool Genotypkombination UH301/UH005 zeigte, dass 6 Gene (AD9, DD7, *nfd105*, CC0063, *dwarf8* und QC5) in allen vier Vergleichen und insgesamt 58 Gene, darunter die Gene DD6, DH2, KG5, NF10, TH5, in drei der vier Vergleichen detektiert wurden. Für Endospermgewebe der intrapool Genotypkombination UH250/UH301 konnte ein Gen (CC0194) in allen vier Vergleichen und 16 Gene, darunter die Gene AD9, DD6, DH2, JC1, KG5, NF10, TH5 und *dwarf8*, in drei der vier Vergleiche nachgewiesen werden.

Der Vergleich beider untersuchten Gewebe und Genotypkombinationen bezüglich der in Hybrid-Inzucht-Vergleichen mehrfach als differentiell detektierten Gene zeigte Gemeinsamkeiten auf. Das Gen AB5 war speziell in Embryogewebe, die Gene *dwarf8*, AD9, DD6, DH2, KG5, NF10 und TH5 in Endospermgewebe beider Genotypkombinationen in den Inzucht-Hybrid-Vergleichen mehrfach differentiell exprimiert. Das Gen CC0063 wurde sowohl in Embryo- als auch in Endospermgewebe der Genotypkombination UH301/UH005 in den Inzucht-Hybrid-Vergleichen mehrfach detektiert. In verschiedenen Geweben beider Genotypkombinationen wurde das Gen JC1 mehrfach als differentiell exprimiert nachgewiesen.

Der Vergleich der differentiellen Genexpression in diploidem Embryo- und triploidem Endospermgewebe der interpool Genotypkombination UH301/UH005 zeigte, dass deutliche Unterschiede zwischen den untersuchten Geweben in Hinblick auf die Genexpression bestehen. Während im Embryogewebe insgesamt 7,3% der untersuchten Genfragmente eine differentielle Expression zeigten, belief sich der Anteil der identifizierten, differentiell exprimierten Gene im Endospermgewebe auf 29,0%. Des Weiteren traten für Endospermgewebe in den verschiedenen Inzucht-Hybrid-Vergleichen klare Unterschiede bezüglich der detektierten Anzahl von signifikant ( $P \leq 0,05$ ) differentiell exprimierten cDNAs auf, die in Embryogewebe nicht erkennbar waren. Während in den Inzucht-Hybrid-Vergleichen „005x005 vs 301x005“ und „301x301 vs 005x301“ des Endosperms insgesamt 591 bzw. 514 cDNAs als signifikant ( $P \leq 0,05$ ) differentiell exprimiert detektiert wurden, konnten in den Vergleichen „005x005 vs 005x301“ und „301x301 vs 301x005“ im Ganzen 56 bzw. 38 cDNAs mit signifikant ( $P \leq 0,05$ ) differentieller Expression nachgewiesen werden (Tab. 7). Die hohe Anzahl an differentiell exprimierten cDNAs, die in den erstgenannten Vergleichen detektiert wurde, war ebenfalls im Vergleich der Inzuchtlinien UH005 und UH301 wieder zu finden. Insgesamt 549 cDNAs zeigten eine signifikant ( $P \leq 0,05$ ) unterschiedliche Expression zwischen den Inzuchtlinien im Endospermgewebe der interpool Genotypkombination (Tab. 7). Ferner konnte im Endospermgewebe der reziproken F1-Hybride eine signifikant ( $P \leq 0,05$ ) differentielle Expression bei 154 cDNAs festgestellt werden (Tab. 7).

Dieses Ergebnis unterschied sich klar von dem Resultat für Embryogewebe. In dem Embryovergleich der reziproken Hybride der interpool Genotypkombination konnte kein Gen als signifikant ( $P \leq 0,05$ ) differentiell exprimiert nachgewiesen werden (Tab. 7).

Die Darstellung der Expressionsdaten erbrachte erweiterte Einblicke in die unterschiedliche Genexpression von Embryo- und Endospermgewebe der interpool Kreuzung (Abb. 18).

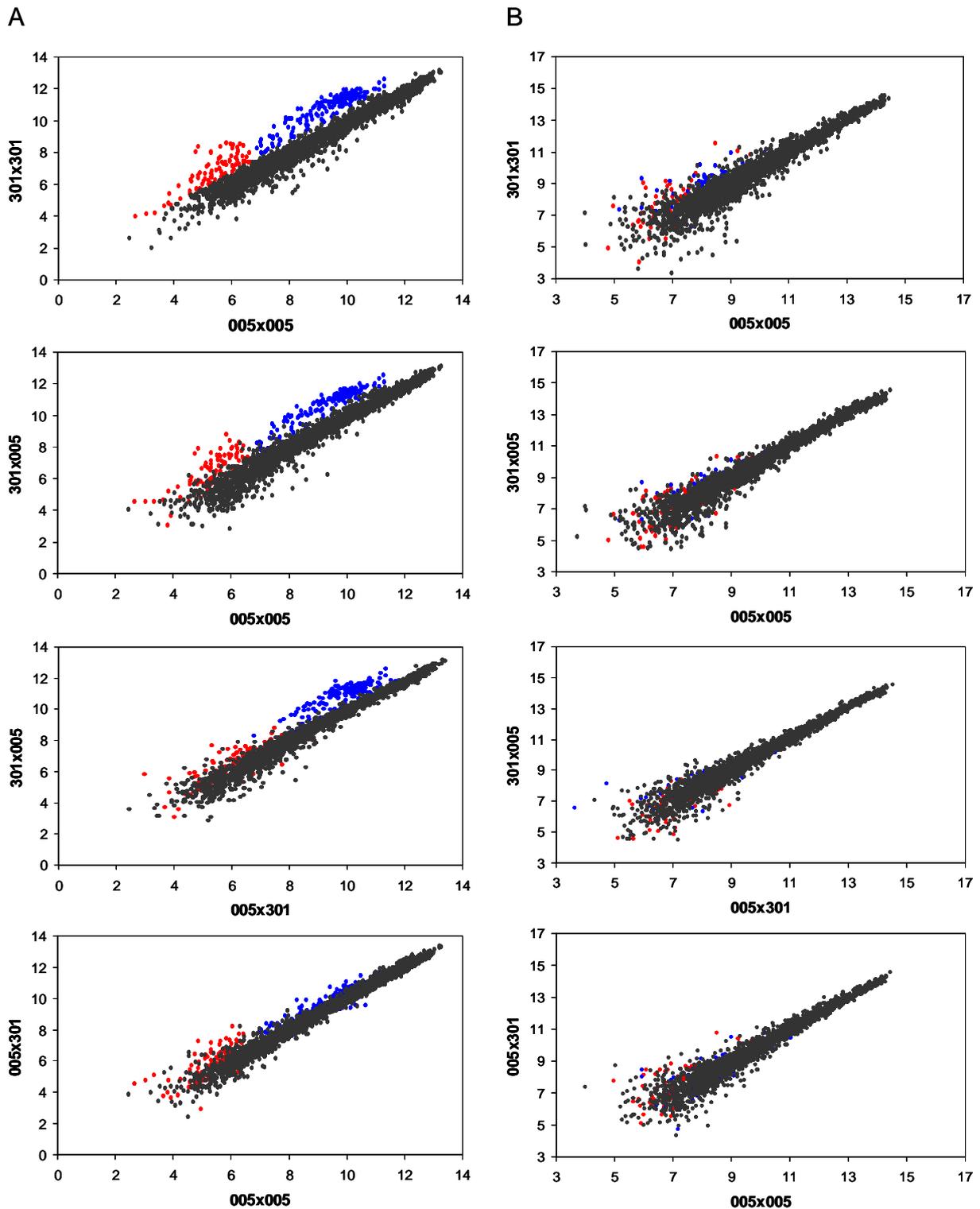
Durch die Expressionsanalysen mit dem Heterosis-3k-Array konnten zwischen den Endospermgeweben der Inzuchtlinien UH301 und UH005 stark differentiell exprimierte cDNAs nachgewiesen werden (Abb. 18A-I). 320 dieser cDNAs zeigten ein besonders erhöhtes Transkriptniveau in der Inzuchtlinie UH301 und grenzten sich in der Abbildung 18A-I deutlich erkennbar von anderen untersuchten Genfragmenten ab. 194 der 320 cDNAs wiesen eine vergleichsweise starke Expression (Kennzeichnung: blau), 126 eine in der Tendenz schwache Expression (Kennzeichnung: rot) auf. Im Hybrid-Inzucht-Vergleich „301x005 vs 005x005“ (Abb. 18A-II) der Endospermgewebe waren die Expressionsverhältnisse in Bezug auf die gekennzeichneten 320 cDNAs nur unwesentlich verändert. Die Gruppe der blau gekennzeichneten cDNAs grenzte sich weiterhin deutlich ab und die rot markierten cDNAs waren als Gruppe erkennbar.

Beim Vergleich des Endospermgewebes der reziproken Hybride (Abb. 18A-III) war eine Veränderung des Expressionsverhaltens nur für die rot markierten cDNAs zu beobachten, während sich die blau gekennzeichneten Genfragmente weiterhin deutlich abgrenzten. Ein Großteil der rot markierten cDNAs zeigte keine differentielle Expression zwischen dem Endospermgewebe der reziproken F1-Hybriden.

Der Vergleich des Endospermgewebes der Genotypen 005x005 und 005x301 deckte in Bezug auf die beiden Gruppen der gekennzeichneten cDNAs deutliche Veränderungen auf (Abb. 18A-VI). Keine der beiden Gruppen grenzte sich als solches klar von anderen cDNAs ab. Zu erkennen war jedoch, dass die meisten der im 005x301 Hybrid stark erhöht exprimierten cDNAs diesen markierten Gruppen zuzuordnen waren.

Die für Endospermgewebe der Genotypkombination UH301/UH005 beobachteten Expressionsverhältnisse waren nicht im Embryogewebe der Genotypkombination UH301/UH005 nachweisbar (Abb. 18B I-IV). Weder grenzte sich eine Gruppe von stark differentiell exprimierten cDNAs in besonderer Weise ähnlich wie in den Endospermvergleichen ab noch zeigten die cDNAs, die auf der Basis des Inzuchtlinienvergleiches des Endospermgewebes (Abb. 18A-I) blau und rot gekennzeichnet wurden, ein vergleichbares Expressionsverhalten. Die Expression der markierten cDNAs war in den Embryogeweben vorwiegend schwach und nicht überwiegend differentiell.

Beim Vergleich des Endospermgewebes der Inzuchtlinien UH250 und UH301 konnten ebenfalls keine stark differentiell exprimierten cDNAs, die als Gruppe klar erkennbar waren, nachgewiesen werden. Auch in weiteren Vergleichen der Endospermgewebe verschiedener Genotypen der intrapool Genotypkombination UH250/UH301 grenzten sich keine differentiell exprimierten cDNAs als Gruppe ab (Daten nicht gezeigt). Die Überprüfung der Expressionsverhältnisse in Embryogeweben der intrapool Genotypkombination UH250/UH301 zeigte ebenso, dass keine differentiell exprimierten cDNAs als Gruppe in besonderer Weise erkennbar waren (Daten nicht gezeigt).



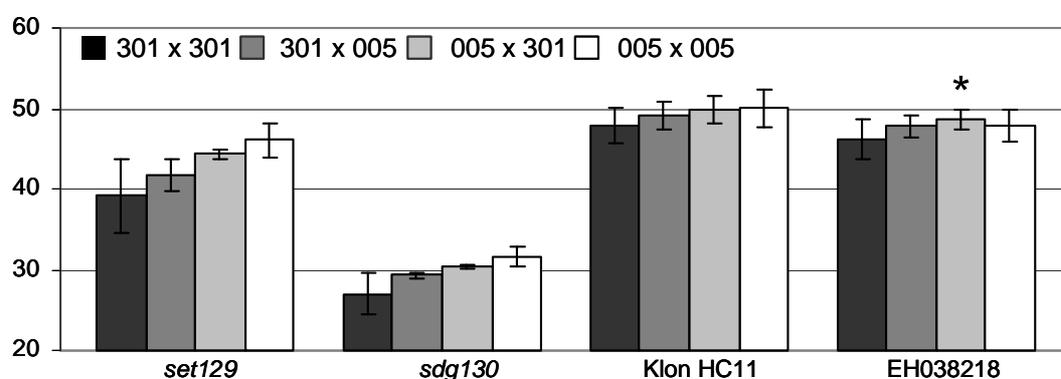
**Abbildung 18: Genexpression im Embryo- und Endospermgewebe der interpool Genotypkombination**

Gezeigt sind die mit Hilfe des Heterosis-3k-Arrays ermittelten Expressionsdaten für A) Endosperm- und B) Embryogewebe der interpool Genotypenkombination UH301/UH005. Auf der Grundlage des Endospermvergleiches „005x005 vs 301x301“ wurde eine farbliche Kennzeichnung der in der Inzuchtlinie UH301 stärker exprimierten cDNAs vorgenommen. Blau: stärker exprimierte cDNAs, rot: schwächer exprimierte cDNAs. Durch die Kennzeichnung kann die Expression dieser cDNAs in den dargestellten Genotypvergleichen der unterschiedlichen Gewebe nachvollzogen werden.

### 3.5.3 Identifikation von differentiell exprimierten Chromatingenen

Insgesamt 38 Chromatingene wurden in den Vergleichen der interpool Genotypkombination UH301/UH005 als signifikant ( $P \leq 0,05$ ) differentiell exprimiert detektiert (Tab. 9; Kapitel 7.3: Tab. 22). 15 dieser Gene zeigten eine differentielle Expression in sechs dap Embryogewebe, 29 Gene in sechs dap Endosperm. Bei sechs Genen wurde in beiden Geweben ein unterschiedliches Transkriptniveau in den Genotypvergleichen festgestellt. Diese Gene codieren ein Polycomb group Protein, eine Histondeacetylase, einen Chromatin remodulierenden Faktor, Histon H2A, Histon H2B und ein SET-Protein. Auch zwischen der interpool Genotypkombination UH301/UH005 und der intrapool Genotypkombination UH250/UH301 waren Gemeinsamkeiten in Hinblick auf die differentielle Expression von Chromatingenen feststellbar (Tab. 9; Kapitel 7.3: Tab. 23). In Endospermgewebe beider Genotypkombinationen wurde eine differentielle Expression für Histon H2A, einen cDNA Klon mit Homologie zum AGO4-Protein aus *Arabidopsis thaliana* sowie für zwei Gene von SET-Proteinen nachgewiesen. Ferner waren die Gene, die für zwei globale Transkriptionsfaktoren und zwei Proteine der Klasse „High Mobility Group Family B“ codieren, im Endospermgewebe beider Genotypkombinationen differentiell exprimiert. Das Gen eines Polycomb group Proteins, das Histon H2A Gen und ein Einzel-myb-Histon Gen zeigten in Embryogewebe beider Genotypkombinationen eine differentielle Expression.

Bemerkenswert war, dass 44,7% der als differentiell exprimiert detektierten Chromatingene eine Histon modifizierende Funktion ausüben und 26,3% der detektierten Chromatingene strukturgebende Proteine codieren. Embryo- und Endospermgewebe unterschieden sich bezüglich der Anteile der differentiell exprimierten Chromatingene an bestimmten Funktionsklassen nicht (Tab. 9). Während jedoch in Embryogewebe vornehmlich sehr starke Unterschiede in den Transkriptniveaus der den Elternlinien bzw. zwischen der Inzuchtlinie UH005 und dem Hybrid 301x005 detektiert wurden, konnte bei Endospermgewebe in einer Vielzahl von Vergleichen signifikant ( $P \leq 0,05$ ) differentielle Expression festgestellt werden (Kapitel 7.3: Tab. 22).



**Abbildung 19: Expressionsmuster von vier Chromatingenen**

Auf der Basis von qRT-PCR Expressionsanalysen nachgewiesene Expressionsmuster in sechs dap Embryogewebe der interpool Genotypkombination UH301/UH005; Fehlerbalken geben die Standardabweichung wieder.

\* signifikant ( $P=0,023$ ) dominante Genexpression, die der Expression in UH005 Inzuchtembryonen gleicht.

qRT-PCR Expressionsanalysen der Gene *set129* und *sdg130* zeigten für sechs das Embryogewebe der interpool Genotypkombination UH301/UH005 einen signifikanten ( $P \leq 0,1$ ) Unterschied der Transkriptmengen in den Inzuchtlinien und eine additive Expression in den reziproken Hybriden. Für das Gen HC11 konnte ebenfalls eine additive Expression in beiden reziproken Hybriden nachgewiesen werden, während für das Gen EH038218 im Hybrid 005x301 eine dominante Expression detektierbar war (Abb. 19).

Bezüglich des Expressionsverhaltens weiterer Chromatingene in den untersuchten Geweben der reziproken Hybride war auffällig, dass eine Tendenz hinsichtlich der Zuordnung bestimmter Expressionsmuster zu bestimmten Funktionsklassen der Chromatingene auf der Basis der Microarrayexpressionsdaten gefunden wurde. Differentiell exprimierte Gene von strukturgebenden Proteinen zeigten in Hybriden vorwiegend ein additives Expressionsmuster, während Chromatingene mit modifizierender, remodulierender oder regulierender Funktion hauptsächlich eine über- bzw. unterdominante Expression in Hybriden aufwiesen (Tab. 8). Gene mit einem signifikanten ( $P \leq 0,1$ ), nicht additiven Expressionsmuster im Endospermgewebe des F1-Hybrids 301x005 codieren zwei Histondeacetylasen, eine Untereinheit eines Chromatin remodulierenden Komplexes, zwei globale Transkriptionsfaktoren, eine Histonacetyltransferase, ein methylbindendes Protein sowie ein SET-Protein (Tab. 9).

**Tabelle 8: Expressionsverhalten der differentiell exprimierten Chromatingene in reziproken F1-Hybriden**

	Überdominant	Additiv	Unterdominant	
Embryo		<i>set129</i> <sup>a</sup>	<i>smh106</i> <sup>a</sup> <i>cha120</i> <sup>a</sup> <i>sdg102</i> <sup>a</sup> <i>sdg137</i> <sup>a</sup>	
	Endosperm	<i>hda113</i> <sup>c</sup>	<i>cenh3</i> <sup>c</sup> <i>fie1</i> <sup>c</sup> <i>hta112</i> <sup>c</sup> <i>nfd101</i> <sup>c</sup> <i>nfd104</i> <sup>c</sup> <i>nfd105</i> <sup>b,c</sup> <i>sdg105</i> <sup>c</sup> <i>set124</i> <sup>c</sup> <i>set129</i> <sup>c</sup>	<i>cha126</i> <sup>c</sup> <i>gtc101</i> <sup>c</sup> <i>gtd101</i> <sup>c</sup> <i>hda117</i> <sup>c</sup> <i>mbd116</i> <sup>c</sup> <i>set115</i> <sup>c</sup> <i>gtb101</i> <sup>c</sup>

Auf der Basis der Expressionsanalysen mit dem Heterosis-3k-Array ermittelte signifikante ( $P \leq 0,1$ ) Expressionsverhalten. Zur bioinformatischen Bestimmung wurden die Formeln  $H = (P_1 + P_2)/2$  für Embryogewebe und  $H = (P_1 + P_2)/3$  für Endospermgewebe genutzt. <sup>a</sup> Embryo 301x005; <sup>b</sup> Endosperm 005x301; <sup>c</sup> Endosperm 301x005

Tabelle 9: Differenziell exprimierte Chromatingene

Bezeichnung <sup>a</sup>	Identität <sup>b</sup>	Klasse <sup>c</sup>	Gewebe <sup>d,e</sup>
<i>cenh3</i>	Histon H3	D	2
<i>cha101</i>	Chromatin remodulierender Komplex Untereinheit R (SWI2/SNF2 Homolog) mit den Proteindomänen AT_hook, SNF2_N und Helikase_C	C	2
<i>cha120</i>	Chromatin Remodulierender Komplex Untereinheit R (SWI2/SNF2 Homolog) mit Helikase-C Domäne	C	1
<i>cha126</i>	Chromatin remodulierender Komplex Untereinheit R (SWI2/SNF2 Homolog) mit SNF2_N Proteindomäne	C	2
<i>chr101</i>	Chromatin remodulierender Komplex Untereinheit R (SWI2/SNF2 Homolog) mit den Proteindomänen AT_hook, SNF2_N und Helikase_C	C	2
<i>fie1</i>	Protein der Polycomb Gruppe mit WD40 Proteindomäne	C	1, 2, 3
<i>gta101</i>	Globaler Transkriptionsfaktor Gruppe A (SPT5 Homolog) mit 4 KWO Proteinbereichen	A	2, 4
<i>gtb101</i>	Globaler Transkriptionsfaktor Gruppe B (SPT6 Homolog)	A	1
<i>gtc101</i>	Globaler Transkriptionsfaktor Gruppe C (SPT16 Homolog) mit Peptidase_24 Domäne	A	2,4
<i>gtd101</i>	Histonacetyltransferase (TafII-250 Familie) mit Bromodomäne	B	2
<i>gte102</i>	Globaler Transkriptionsfaktor Gruppe E (BDF1-FSH-RING3 Homolog) mit Bromodomäne	A	2
<i>hac114</i>	Histonacetyltransferase (CBP Familie) mit zz Domäne	B	2
<i>hda104</i>	Histondeacetylase (HD2 Familie) mit den Proteindomänen Nucleoplasmin und zf-C2H2	B	1
<i>hda105</i>	Histondeacetylase (HD2 Familie) mit den Proteindomänen Nucleoplasmin und zf-C2H2	B	2
<i>hda113</i>	Histondeacetylase (SIR2 Familie) mit SIR2 Domäne	B	2
<i>hda117</i>	Histondeacetylase (RPD3/HDA1 Superfamilie)	B	1, 2
<i>hdt102</i>	Histondeacetylase (HD2 Familie) mit den Proteindomänen Nucleoplasmin und zf-C2H2	B	2
<i>hta112</i>	Histon H2A	D	1, 2, 3, 4
Klon CC1104	Putatives Histone H2B (NP_915412.1) [ <i>Oryza sativa</i> ]; 2e-36	D	1, 2
Klon CH4 <sup>a</sup>	<sup>b</sup> Chromatin remodulierender Faktor CHD3 (AAL47211.1) [ <i>Oryza sativa</i> ], 6e-61	C	1, 2
Klon HC11 <sup>a</sup>	<sup>b</sup> Nucleosomen / Chromatin assemblierender Faktor C (AF384037.1) [ <i>Zea mays</i> ], 0.0	D	1
Klon NE8 <sup>a</sup>	<sup>b</sup> putatives SET-Protein SUV2 (XP_466798.1) [ <i>Oryza sativa</i> ], 1e-34	B	2
Klon UH7 <sup>a</sup>	<sup>b</sup> AGONAUT 4 (AGO4) (NP_565633.1) [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ], 5e-84	A	2, 4
<i>mbd116</i>	Protein mit Methyl-Bindendem Proteinbereich	B	2
<i>nfc102</i>	Nucleosomen/Chromatin assemblierender Faktor Gruppe C (MSI1 Homolog) mit 4 WD40 Proteinbereichen	D	2
<i>nfd101</i>	Protein der Klasse "High Mobility Group Family B" mit HMG_box Proteindomäne	D	2
<i>nfd104</i>	Protein der Klasse "High Mobility Group Family B" mit HMG_box Proteindomäne	D	2, 4
<i>nfd105</i>	Protein der Klasse "High Mobility Group Family B" mit HMG_box Proteindomäne	D	2,4
<i>sdg102</i>	SET Proteine mit SET Domäne	B	1
<i>sdg105</i>	SET-Protein mit den Proteindomänen YDG_SRA, Pre-SET und SET	B	2, 4
<i>sdg130</i>	SET Proteine mit den Proteindomänen zf-MYND und SET	B	1
<i>sdg135</i>	SET Proteine mit den Proteindomänen SET, Pre-SET und YDG-SRA	B	1
<i>sdg137</i>	SET Proteine mit den Proteindomänen SET, Pre-SET und YDG-SRA	B	1
<i>set115</i>	SET-Protein mit SET Domäne	B	2
<i>set124</i>	SET-Protein mit den Domänen CXC und SET	B	2, 4
<i>set129</i>	SET Proteine mit SET Domäne	B	1,2
<i>smh104</i>	Einzel-myb-Histon mit dem Proteinbereich zur Myb-DNA Bindung und der Proteindomäne: Linker-Histon	D	2
<i>smh106</i>	Einzel-myb-Histon mit dem Proteinbereich zur Myb-DNA Bindung und der Proteindomäne: Linker-Histon	D	1, 3

Übersicht über signifikant ( $P \leq 0,05$ ) differenziell exprimierte Chromatingene der interpool Genotypkombination UH301/UH005; Bezeichnung und Identität entsprechen den Angaben der Datenbank (www.chromdb.org).

<sup>a</sup> Klone der subtrahierten cDNA-Banken: CH4 (EH038218): EMB 301x005-005x005; HC11, UH7: EMB 301x005-301x301; NE8: END 301x005-005x005

<sup>b</sup> Homologie zu Proteinsequenzen der Datenbanken ermittelt durch BlastX Analyse (Datenbanknummer.), [Organismus], E-Wert

<sup>c</sup> Zuordnung zu den Funktionsklassen: A: Allgemeine Genaktivität regulierende Enzyme, B: Histon modifizierende Enzyme, C: Chromatin remodulierende Enzyme, D: Strukturgene

<sup>d</sup> differentielle Expression in den Geweben: 1: Embryo UH301/UH005, 2: Endosperm UH301/UH005

<sup>e</sup> Falls detektiert: differentielle Expression in: 3: Embryo UH250/UH301, 4: Endosperm UH250/UH301

### 3.5.4 Differentielles Auftreten von transponierbaren Elementen und Transkripten assoziierter Gene

Interessanterweise konnte ein unterschiedliches Vorkommen von RNA-Zwischenstufen transponierbarer Elemente und eine differentielle Expression von Genen, deren Genprodukte mit Transposition in Verbindung stehen, zwischen Hybrid- und Inzuchtlinien der interpool Genotypkombination UH301/UH005 festgestellt werden (Tab. 10; Kapitel 7.3: Tab. 24).

**Tabelle 10: Differentiell exprimierte transponierbare Elemente und assoziierte Gene**

Bezeichnung <sup>a</sup>	Identität <sup>b</sup>	Gewebe <sup>c, d</sup>
<i>CentA</i>	Retrotransposon ähnliches Element [ <i>Zea mays</i> ] (Ananiev <i>et al.</i> , 1998)	2 <sup>d</sup>
<i>Cin4</i>	Retrotransposon [ <i>Zea mays</i> ]	2 <sup>d</sup>
<i>Cinful</i>	Retrotransposon [ <i>Zea mays</i> ] (Sanz-Alferez <i>et al.</i> , 2003)	1
<i>Gypsy</i>	Retrotransposon [ <i>Zea mays</i> ] (Meyers <i>et al.</i> , 2001)	1
Klon AH4 <sup>a</sup>	<sup>b</sup> Putatives Protein eines transponierbaren Elementes (ABA94904.1) [ <i>Oryza sativa</i> ], 8e-65	1
Klon BC7 <sup>a</sup>	<sup>b</sup> putatives Mutator-Protein (AAM88614.1) [ <i>Oryza sativa</i> ], 3e-22	1
Klon CC8 <sup>a</sup>	<sup>b</sup> <i>Zea mays Copia</i> ähnliches Retrotransposon Sto-1 (AF082127.1) [ <i>Zea mays</i> ], 1e-84	1, 2
Klon GG6 <sup>a</sup>	<sup>b</sup> putatives Protein "target of myb1" (BAD08174.1) [ <i>Oryza sativa</i> ], 6e-69	1
Klon OA11 <sup>a</sup>	<sup>b</sup> Putatives Protein eines transponierbaren Elementes (ABA93947.1) [ <i>Oryza sativa</i> ], 2e-22	2
Klon RG10 <sup>a</sup>	putative Transposase (AAR96246.1) [ <i>Oryza sativa</i> ], 6e-15	1, 2
Klon TF6 <sup>a</sup>	<sup>b</sup> Protein ähnlich einem Protein mit HGWP Wiederholungen (BAD36117.1) [ <i>Oryza sativa</i> ], 8e-63	1, 2
<i>Opie</i>	Retrotransposon [ <i>Zea mays</i> ] (SanMiguel <i>et al.</i> , 1996)	2 <sup>d</sup>
<i>Prem-1</i>	Retrotransposon [ <i>Zea mays</i> ] (Turcich und Mascarenhas 1994)	2
<i>Prem-2</i>	Ty1-Klasse Retrotransposon [ <i>Zea mays</i> ] (Turcich <i>et al.</i> , 1996)	2 <sup>d</sup>
<i>Reina</i>	TY3-Klasse Retrotransposon [ <i>Zea mays</i> ] (Avramova <i>et al.</i> , 1996)	1
<i>Stonor</i>	Retrotransposon [ <i>Zea mays</i> ] (Marillonnet und Wessler 1998)	2 <sup>d</sup>

Signifikant ( $P \leq 0,05$ ) differentiell exprimierte transponierbare Elemente und Gene, deren Produkte mit Transposition in Verbindung stehen, der interpool Genotypkombination UH301/UH005; Bezeichnung der Retrotransposons entsprechend der Literatur

<sup>a</sup> Klone der subtrahierten cDNA-Banken : AH4 (EE297712 ), BC7, CC8, TF6: EMB 301x005-005x005; GG6: EMB 301x005-301x301; OA11: END 301x005-005x005; RG10: END 301x005-301x301

<sup>b</sup> Homologie zu Protein- und Nukleotidsequenzen der Datenbanken ermittelt durch BlastX und BlastN Analysen (Datenbanknummer), [Organismus], E-Wert

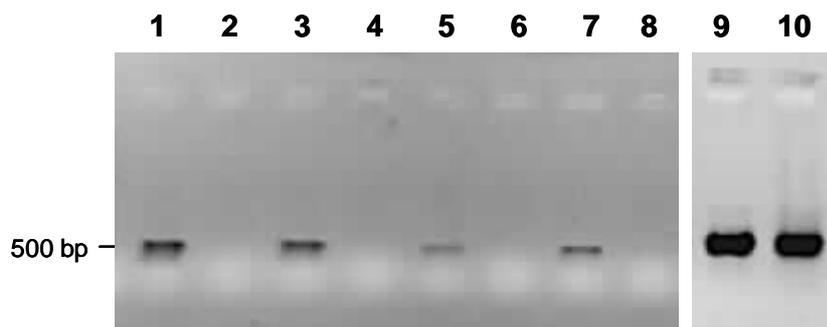
<sup>c</sup> differentielle Expression in den Geweben: 1: Embryo UH301/UH005, 2: Endosperm UH301/UH005

<sup>d</sup> Feststellung von Unterdominanz im Endospermgewebe des Hybrids 301x005; Für die bioinformatische Bestimmung des signifikanten ( $P \leq 0,1$ ) Expressionsverhaltens wurde die Formel  $H-(P_1+P_2)/3$  für Endospermgewebe genutzt.

Insgesamt waren für 10 verschiedene Retrotransposonelemente Unterschiede zwischen den untersuchten Genotypen im Embryo und/oder Endosperm nachweisbar, wobei in Vergleichen zwischen einer Inzuchtlinie und einem Hybrid stets ein verstärktes Auftreten der RNA-Zwischenprodukte in der Inzuchtlinie über Microarrayanalysen detektiert wurde (Kapitel 7.3: Tab. 24). Im Embryogewebe konnte in Hinblick auf die transponierbaren Elemente *Gypsy* und *Reina* ein deutlicher Unterschied in den Transkriptniveaus der Inzuchtlinien UH005 und UH301 festgestellt werden. qRT-PCR Analysen bestätigten in sechs dap Embryonen den signifikanten ( $P=0,13$ ) Unterschied für das Retrotransposon *Reina* (Abb. 21). Die Microarrayexpressionsdaten zeigten für das heterozygote Endospermgewebe 301x005 ein signifikant verringertes

Auftreten der RNA-Zwischenstufen der Elemente *CentA*, *Cin4*, *Opie*, *Prem-2* und *Stonor* (Kapitel 7.3: Tab. 24). Auf der Basis von bioinformatischen Analysen der Microarray-expressionsdaten konnte ein signifikant ( $P \leq 0,1$ ) unterdominantes Expressionsverhalten dieser transponierbaren Elemente im Endosperm des Hybrids 301x005 festgestellt werden (Tab. 10).

Für sechs Gene, deren Genprodukte mit Transposition in Verbindung stehen, konnte eine differentielle Expression im Embryo- bzw. Endospermgewebe nachgewiesen werden. Sie codieren für eine Transposase, ein Mutatorprotein und für vier Proteine, die transponierbaren Elementen zugeordnet werden (Tab. 10). Die Expressionsdaten, die mit Hilfe des Heterosis-3k-Arrays ermittelt wurden, zeigten generell eine höhere Expression dieser Gene in der Inzuchtlinie UH301 oder den reziproken Hybriden im Vergleich zur Inzuchtlinie UH005. Dieses dominante Expressionsmuster konnte in qRT-PCR Expressionsanalysen für den Klon TF6 in sechs dap Embryogewebe der interpool Genotypkombination UH301/UH005 verifiziert werden (Abb. 21). PCR Untersuchungen unter Verwendung von cDNA verschiedener Gewebe der Inzuchtlinien UH301 und UH005 zeigten ferner eindeutig, dass unabhängig vom Gewebe oder Entwicklungsstand eine unterschiedliche Transkripthäufigkeit zwischen den Inzuchtlinien vorlag (Abb. 20).



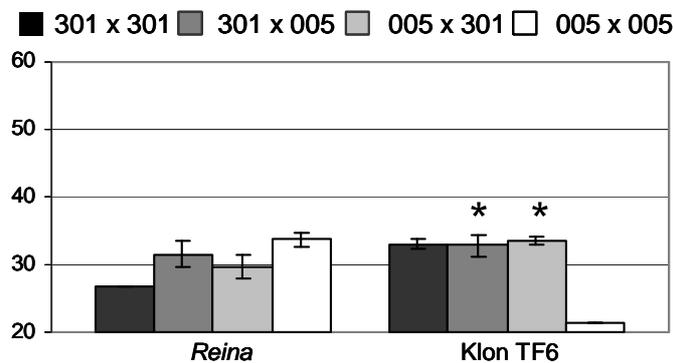
**Abbildung 20: Differentielle Expression des Gens TF6 in den Inzuchtlinien UH301 und UH005**

PCR amplifizierte cDNA- und genomische Fragmente des TF6-Gens; cDNA von sechs dap Embryonen, sechs dap Endosperm, 14 dap Endosperm sowie Keimlingen und gDNA der Inzuchtlinien UH301 und UH005 wurden in PCR-Reaktionen mit 35 Zyklen eingesetzt und anschließend über Agarosegelelektrophorese untersucht. Spur 1: sechs dap EMB UH301, Spur 2: sechs dap EMB UH005, Spur 3: sechs dap END UH301, Spur 4: sechs dap END UH005, Spur 5: 14 dap END UH301, Spur 6: 14 dap END UH005, Spur 7: Keimling UH301, Spur 8: Keimling UH005, Spur 9: gDNA UH005, Spur 10: gDNA UH301; 1,2% Gel

Während in Embryogewebe in den verschiedenen Genotypen ein unterschiedliches Vorkommen von 4 Retrotransposonelementen und die differentielle Expression von 5 der sechs Proteingene detektiert wurde, traten in Endospermgewebe der verschiedenen Genotypen die RNA-Zwischenstufen von 7 Retrotransposons und die Transkripte von drei Proteingenen mit unterschiedlicher Häufigkeit auf. In beiden Geweben waren in übereinstimmender Weise ein *Copia* ähnliches Retrotransposon, eine Transposase und ein Protein mit HGWP Wiederholungen unterschiedlich exprimiert (Tab. 10).

Im Rahmen der Sequenzierung von 360 differentiell exprimierten Genfragmenten des Heterosis-3k-Arrays wurde eine z. T. starke Redundanz in den subtrahierten cDNA Banken aus Embryo- und Endospermgewebe in Hinblick auf transponierbare Elemente und assoziierte Gene festgestellt. Der Klon RG10 stand stellvertretend für das größte Cluster mit 80 identischen

Sequenzen. Die Sequenz des Klons TF6 wurde zehnmal, die des Klons AH4 fünfmal und die Sequenzen von OA11 und CC8 jeweils zweimal vorgefunden.



**Abbildung 21: Expressionsmuster von *Reina* und dem Gen TF6 in sechs dap Embryonen**

Durch qRT-PCR Expressionsanalysen nachgewiesene Expressionsmuster von *Reina* und dem Klon TF6, der Homologie zu einem Protein mit HGWP-Wiederholungen zeigte, in sechs dap Embryogewebe der interpool Genotypkombination UH301/UH005; Fehlerbalken geben die Standardabweichung wieder. Nicht vorhandene Fehlerbalken verweisen darauf, dass der Nachweis der RNAs bzw. Transkripte nur in einer Probe möglich war.

\* Auf der Basis von statistischen Analysen unter Verwendung zweiseitiger, studentischer T-Tests konnte ein signifikant ( $P \leq 0,01$ ) dominantes Genexpressionsverhalten nachgewiesen werden.

### 3.6 Analyse der Heterosis assoziierten Genexpression in sechs dap Embryonen

#### 3.6.1 Sequenzanalysen von Heterosis assoziierten Genen und funktionelle Klassifikation

Unter Verwendung des Heterosis-3k-Arrays konnten 223 Genfragmente als signifikant ( $P \leq 0,05$ ) differentiell in mindestens einem Genotypvergleich der sechs dap Embryonen der interpool Genotypkombination UH301/UH005 identifiziert werden (Tab. 7). 74% dieser Genfragmente waren auf der Basis von Sequenzdaten charakterisierbar. Hierzu gehörten 12 Gene von Chromatin assoziierten Proteinen ([www.chromdb.org](http://www.chromdb.org)) (Tab. 9), drei Retrotransposonsequenzen (Tab. 10), fünf Gene, die durch Kooperationspartner zur Verfügung gestellt wurden, sowie 39 cDNAs aus Ei- und Zentralzellbanken und 106 sequenzierte Klone der subtrahierten cDNA-Banken aus sechs dap Embryo- und Endospermgewebe.

Im Gegensatz zu den Chromatingenen, den Retrotransposonsequenzen und dem Gen *gln4*, die speziell ausgewählte, bereits charakterisierte Elemente des Heterosis-3k-Arrays darstellten, unterlagen die cDNAs der Eizell- und Zentralzellbanken, der Banken aus dem Zweizellstadium sowie der subtrahierten Embryo- und Endospermbanken keiner Selektion. Diese Banken waren in Bezug auf die Sequenzidentität der cDNAs weitgehend uncharakterisiert. Um die 149 vorliegenden Sequenzen der differentiell exprimierten cDNAs dieser Banken näher zu untersuchen, wurden Clusteranalysen durchgeführt. Die Analysen zeigten, dass 113 (75,8%) dieser cDNAs einzigartig waren. Von den 36 redundanten cDNAs wurde jeweils die längste Sequenz eines Clusters für weitere Analysen verwendet.

Die vier identifizierten, differentiell exprimierten cDNAs aus dem Zweizellstadium stellten einzigartige Sequenzen dar. Fünf der 39 differentiell exprimierten cDNAs aus der Zentralzelle

waren redundant und bildeten zwei Cluster. Der Klon CC0622 repräsentiert ein Cluster mit drei cDNAs. Die cDNA-Sequenz, die im Weiteren durch den Klons CC0447 vertreten wird, wurde zweifach detektiert. Von 106 sequenzierten, differentiell exprimierten cDNAs der subtrahierten Banken aus Embryo- und Endospermgewebe waren 73 cDNAs (68,9%) einzigartig. Die redundanten cDNAs konnten sieben Clustern zugeordnet werden. Das größte Cluster mit 19 cDNAs ist nachfolgenden durch den Klon RG10 repräsentiert. Der Klon CG8 steht stellvertretend für sieben redundante Sequenzen, der Klon TF6 für vier. Eine Gruppe von jeweils drei gleichen Sequenzen vertreten die Klone DH2 und LE10. Die Klone GD8 und DD6 repräsentieren je ein Cluster mit jeweils zwei identischen Sequenzen.

Sechs (AH4, CE8, CG8, DH2, FB10 und IE11) der 73 einzigartigen cDNAs der subtrahierten Embryo- und Endospermbanken wurden bereits im differentiellen Screening mit subtrahierten cDNA-Populationen als stark differentiell exprimiert identifiziert. Für die verbleibenden 67 cDNAs der subtrahierten Embryo- und Endospermbanken, für die cDNAs aus dem Zweizellstadium und der Eizelle sowie Zentralzelle wurden Sequenzhomologien mit Hilfe des BLAST-Programmes (Altschul *et al.*, 1997) bestimmt. Dies geschah auf der Basis von nicht redundanten, öffentlichen Sequenzdatenbanken und Datenbanken, die Transkriptsequenzen aller Spezies außer Maus und Mensch zusammenfassen. Die Tabelle 11 gibt die ermittelten Homologien dieser cDNAs und der sechs schon im Screening identifizierten cDNAs sowie die Länge der Sequenz und die Datenbanknummer, falls diese vorhanden ist, wieder. Ferner enthält Tabelle 11 Informationen zu den differentiell exprimierten Genen, die von Kooperationspartnern zur Verfügung gestellt wurden.

Von 113 einzigartigen cDNAs der subtrahierten Banken aus Embryo- und Endospermgewebe, dem Zweizellstadium sowie der Eizelle und Zentralzelle, die differentiell exprimiert waren und sequenziert wurden, repräsentierten vier cDNAs bislang unbekannte Gene. Für diese cDNAs konnten weder Homologien zu Sequenzen aus Protein- und Nukleotiddatenbanken noch zu Sequenzen aus Transkriptdatenbanken gefunden werden, wobei die Ausschlussgrenze für signifikant homologe Sequenzen  $e < 10^{-10}$  betrug. Dem gegenüber konnten für 109 cDNAs, 73,2% der differentiell exprimierten, sequenzierten cDNAs aus uncharakterisierten Banken, hohe Homologien zu Datenbankeintragen ermittelt werden. 85 Sequenzen besaßen eine Homologie zu Proteinen oder Nukleotidsequenzen, die den Bezug zu einem bestimmten Gen herstellten. Auf der Basis von funktionellen Kategorien, die durch MIPS etabliert wurden (Rudd *et al.*, 2003), konnten 76 Sequenzen in 13 funktionelle Kategorien eingestuft werden.

Die Abbildung 22 zeigt die Anzahl der einzigartigen, differentiell exprimierten Gene aus nicht charakterisierten Banken, die funktionellen Klassen zugeordnet werden konnten. 56 Gene (73,7%) mit Homologie zu charakterisierten Proteinen oder Genen konnten in eine der 13 funktionellen Kategorien eingeordnet werden. Bei 20 Genen wurde eine Einstufung in zwei oder mehr Kategorien vorgenommen.

Tabelle 11: Heterosis assoziierte Gene in sechs dap Embryonen der Genotypkombination UH301/UH005

Klon	Datenbank-nummer	Länge [bp]	BlastX Sequenzhomologie (Datenbanknummer) <sup>a, b</sup>	E-Wert
Differenziell exprimierte Gene der subtrahierten cDNA-Banken aus sechs dap Embryo- und Endospermgewebe				
AD2		617	Putative Acyl-CoA Synthetase (ABA95920.1) [ <i>Oryza sativa</i> ]	2e-107
AE1		970	Protein ähnlich dem mitochondrialen Transkriptionsterminationsfaktor (XP_467809.1) [ <i>Oryza sativa</i> ]	2e-32
AH1		449	Gentranskript ohne bekannte Funktion	-
AH4	EE297712	754	Putatives Protein eines transponierbaren Elementes (ABA94904.1) [ <i>Oryza sativa</i> ]	8e-65
BA7		662	Protein ähnlich einem Transkriptionsfaktor (BAD73738.1) [ <i>Oryza sativa</i> ]	6e-41
BC10		985	Gentranskript ohne bekannte Funktion	-
BC7		580	Putatives Mutatorprotein (AAM88614.1) [ <i>Oryza sativa</i> ]	3e-22
BG9		568	Gentranskript ohne bekannte Funktion	-
BH6		653	Putatives Ribophorin I Homolog (CAA74910.1) [ <i>Hordeum vulgare</i> ]	2e-43
CC8		587	Copia-ähnliches Retrotransposon Sto-1 (AF082127.1) [ <i>Zea mays</i> ]	1e-84
CD3		1258	Putative Acetyl-CoA C-Acyltransferase (XP_450298.1) [ <i>Oryza sativa</i> ]	8e-54
CE8		713	Gentranskript ohne bekannte Funktion	-
CG4		476	Katalytisches Eisen-Ionen bindendes Protein (NP_188597.1) [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]	2e-21
CG8	EE297730	210	Gentranskript ohne bekannte Funktion	-
CH4	EH038218	585	Chromatin remodulierender Faktor CHD3 (AAL47211.1) [ <i>Oryza sativa</i> ]	6e-61
DA4		471	Dynamin ähnliches Protein (BAD86966.1) [ <i>Oryza sativa</i> ]	3e-62
DA5		700	Protein ähnlich einem Protein mit PPR Wiederholungen (BAB61147.1) [ <i>Oryza sativa</i> ]	6e-33
DD6		421	Gentranskript ohne bekannte Funktion	-
DF8		399	Putatives RNA bindendes Protein (NP_909840.1) [ <i>Oryza sativa</i> ]	7e-48
DH2	EE297736	740	Protein ähnlich der Proteinkinase MSK-3 (CAB87631.1) [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]	2e-61
EC1	EH038219	396	Gentranskript ohne bekannte Funktion	-
EE3		261	Gentranskript ohne bekannte Funktion	-
EH12		400	Gentranskript ohne bekannte Funktion	-
EH2	EH038220	596	Putatives Zellkernprotein P120 in proliferierenden Zellen (BAD12915.1) [ <i>Oryza sativa</i> ]	3e-36
FA12		352	Bislang unbekannte Sequenz	-
FB10	EE297749	393	Unbekanntes Protein (XP_469322.1) [ <i>Oryza sativa</i> ]	4e-27
FC10		245	Gentranskript ohne bekannte Funktion	-
FC11		996	Phragmoplast assoziiertes Kinesin verwandtes Protein 1 (AAF78897.1) [ <i>Oryza sativa</i> ]	1e-133
FF8	EH038206	642	(→ DV492610.1) Putative Helikase (AAM76346.1) [ <i>Oryza sativa</i> ]	4e-36
GC10	EH038207	382	Gentranskript ohne bekannte Funktion	-
GC3		269	Gentranskript ohne bekannte Funktion	-
GD7		568	Putative DNA Polymerase alpha Untereinheit (BAC43176.1) [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]	2e-46
GD8	EH038208	415	(→ AY107974.1) RNA Polymerase Rpb1 (ABA91105.2) [ <i>Oryza sativa</i> ]	5e-09
GF3		418	Putatives ribosomales 60S Protein L23A (NP_908898.1) [ <i>Oryza sativa</i> ]	3e-25
GG6		650	Putatives Protein "target of myb1" (BAD08174.1) [ <i>Oryza sativa</i> ]	6e-69
HC11		618	Nucleosomen / Chromatin assemblierender Faktor C (AF384037.1) [ <i>Zea mays</i> ]	0.0
HE2		398	Putatives Protein mit Sec63 Domäne (XP_469692.1) [ <i>Oryza sativa</i> ]	7e-48
IC11		383	Putativer SC35 ähnlicher Splicing-Faktor SCL30a (XP_479243.1) [ <i>Oryza sativa</i> ]	1e-33
IE11	EE297768	461	Katalytische Proteinphosphatase Type 2C (NP_174731.1) [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]	5e-57
IG4		665	Putative Ubiquitin spezifische Protease 6 (BAD88117.1) [ <i>Oryza sativa</i> ]	1e-142
JC1	EH038210	516	(→ CO447404.1) Putatives RING-H2 Zink-Finger Protein (AAP85546.1) [ <i>Oryza sativa</i> ]	4e-9
JD10	EH038209	625	Protein, das in Gehirn und reproduktiven Organen exprimiert wird (BAD53578.1) [ <i>Oryza sativa</i> ]	1e-89
KG1		304	Gentranskript ohne bekannte Funktion	-
KG9		721	Putative Diphosphat-Fruktose-6-Phosphat 1-Phosphotransferase alpha Kette (XP_467453.1) [ <i>Oryza sativa</i> ]	2e-123
LB7	EH038212	503	Protein, das einen ACT Bereich enthält (ABA95833.1) [ <i>Oryza sativa</i> ]	3e-76
LB9		349	LON1 Protease (U85494.1) [ <i>Zea mays</i> ]	7e-150
LC1		399	Protein ähnlich der alpha Keto-Säure Dehydrogenase E1 alpha Untereinheit (ABA95971.1) [ <i>Oryza sativa</i> ]	9e-36
LE10		523	Putative Ubiquinol-Cytochrom-c Reductase (ABA91661.1) [ <i>Oryza sativa</i> ]	1e-29
MA7	EH038213	1068	Putativer Translationsinitiationsfaktor eIF-2B epsilon Untereinheit (BAD22043.1) [ <i>Oryza sativa</i> ]	1e-122
MG1		410	Putative System-A-Transporter Isoform 2 (BAD37809.1) [ <i>Oryza sativa</i> ]	2e-45
NA2		260	Gentranskript ohne bekannte Funktion	-
NC8		320	"Shaggy" verwandte Proteinkinase gamma (BAB40983.1) [ <i>Oryza sativa</i> ]	7e-32
NE3		549	Unbekanntes Protein [ <i>Pennisetum ciliare</i> ] (AAK15504.1)	1e-40
NF9		257	Gentranskript ohne bekannte Funktion	-
NG3		336	Gentranskript ohne bekannte Funktion	-

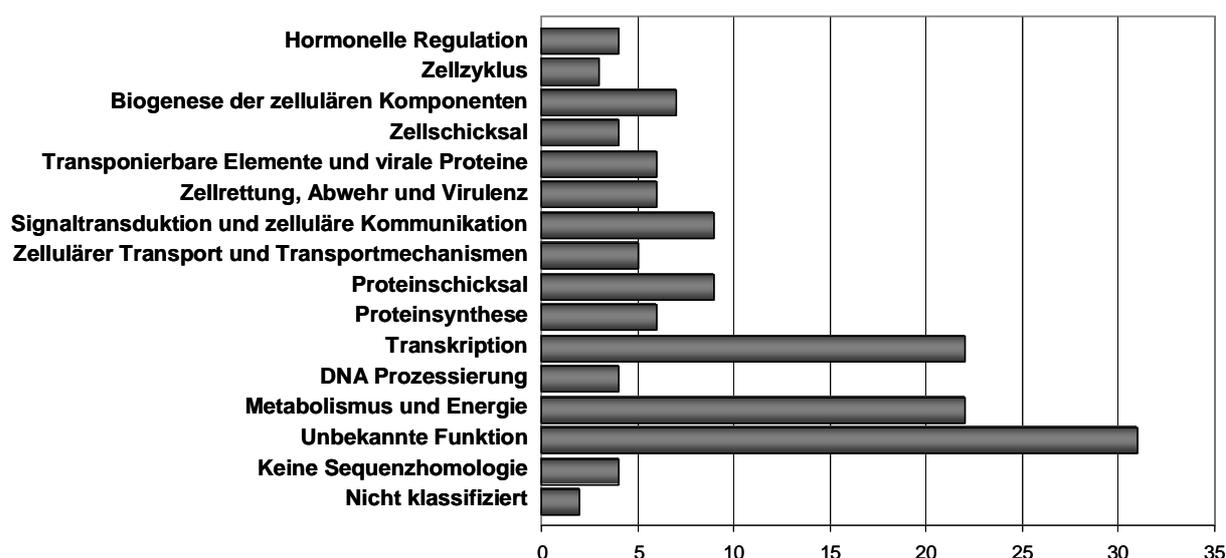
## Fortsetzung der Tabelle 11

Klon	Datenbank-nummer	Länge [bp]	BlastX Sequenzhomologie (Datenbanknummer) <sup>a</sup>	E-Wert
OA5		396	Putative S ähnliche RNase (BAD82178.1) [ <i>Oryza sativa</i> ]	4e-57
OB10		682	Putatives JD1 (BAD54060.1) [ <i>Oryza sativa</i> ]	2e-86
OF10		293	Putative Vacuolen-Typ H <sup>+</sup> -transportierende anorganische Pyrophosphatase (BAD27918.1) [ <i>Oryza sativa</i> ]	8e-23
OF8		636	Unbekanntes Protein [ <i>Oryza sativa</i> ] (XP_469994.1)	3e-33
OH9		315	GDP dissoziierendes Inhibitorprotein (GDI1) (AY346010.1) [ <i>Hordeum vulgare</i> ]	2e-17
PD7		785	Putativer Faktor der Auxin-Antwort 75 (CAD29645.1) [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]	1e-23
QE10		436	Nicht Clathrin ummanteltes Protein zeta2-COP (BAA93045.1) [ <i>Zea mays</i> ]	1e-35
QF8		1150	Putativer TAF5 (BAD37340.1) [ <i>Oryza sativa</i> ]	4e-170
RB5		466	Gentranskript ohne bekannte Funktion	-
RG10		451	Putative Transposase (AAR96246.1) [ <i>Oryza sativa</i> ]	6e-15
RG11		326	Oligouridylat bindendes Protein (CAB75429.1) [ <i>Nicotiana plumbaginifolia</i> ]	4e-13
SA11	EH03815	376	Putative CBL interagierende Proteinkinase 1 (BAA96628.1) [ <i>Oryza sativa</i> ]	5e-25
SE7		322	Putative 2-Oxoglutarat Dehydrogenase, E1 Untereinheit (XP_479634.1) [ <i>Oryza sativa</i> ]	3e-21
TB6		538	Bislang unbekannte Sequenz	-
TC5		452	Zellwandprotein (M36912.1) [ <i>Zea mays</i> ]	0.0
TE7		513	Putatives Transkriptionsregulationsprotein (AAP54975.1) [ <i>Oryza sativa</i> ]	2e-59
TF11		627	Diacylglycerol Kinase 2 (ABA96787.1) [ <i>Oryza sativa</i> ]	2e-111
TF6		702	Protein ähnlich einem Protein mit HGWP Wiederholungen (BAD36117.1) [ <i>Oryza sativa</i> ]	8e-63
Eizell- und Zentralzellbanken				
CC0110		743	Alpha Tubulin (ABG78593.1) [ <i>Oryza sativa</i> ]	3e-95
CC1104		660	Putatives Histone H2B (NP_915412.1) [ <i>Oryza sativa</i> ]	2e-36
CC1115		460	Gentranskript ohne bekannte Funktion	-
CC0361		668	Protein ae1 (CAB56550.1) [ <i>Zea mays</i> ]	3e-65
CC0115		374	Exonuklease (NP_566502.1) [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]	3e-13
CC0013		610	Putative Fettsäurehydroxylase (NP_909885.1) [ <i>Oryza sativa</i> ]	1e-77
CC0994		460	<sup>a</sup> Kälteakklimatisierungsprotein COR413-PM1 (AY181208.1) [ <i>Zea mays</i> ]	0.0
CC0244		630	Ribosomales Protein L35A (AAL59231.1) [ <i>Zea mays</i> ]	5e-59
CC0245		788	Putative Proteinase Nepenthesin II (BAD53242.1) [ <i>Oryza sativa</i> ]	1e-106
CC0032		750	Putative Calcium abhängige Proteinkinase (XP_475398.1) [ <i>Oryza sativa</i> ]	5e-22
CC0385		262	Gentranskript ohne bekannte Funktion	-
CC0998		777	Superoxid-Dismutase (P23346) [ <i>Zea mays</i> ]	2e-84
CC0433		676	Translationsinitiationsfaktor 5A (CAA69225.1) [ <i>Zea mays</i> ]	3e-79
CC0437		448	<sup>a</sup> LIP5 (AB011368.1) [ <i>Oryza sativa</i> ]	2e-37
CC0447	DW475393	512	Putativer plastidärer ATP/ADP Transporter (BAD68020.1) [ <i>Oryza sativa</i> ]	2e-32
CC0456		765	Bislang unbekannte Sequenz	-
CC0530		453	Gentranskript ohne bekannte Funktion	-
CC0541		677	Putativer Translationselongationsfaktor eEF-1 beta Kette (NP_910927.2) [ <i>Oryza sativa</i> ]	1e-30
CC0055		411	Putative Ubiquinol-Cytochrom-c Reductase (AAX95093.1) [ <i>Oryza sativa</i> ]	7e-10
CC1042		287	Gentranskript ohne bekannte Funktion	-
CC0063		510	Hitzeschockprotein 70 (Hsc70-5) (CAB89371.1) [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]	5e-16
CC0638		742	Putatives Thioredoxin ähnliches U5 kleines Ribonukleoprotein Partikel Protein (NP_922068.1) [ <i>Oryza sativa</i> ]	2e-77
CC0622	DW475554	513	Adenosin-Kinase (CAB40376.1) [ <i>Zea mays</i> ]	2e-79
CC0677		533	Putative Serin/Threonin Phosphatase (AAV44139.1) [ <i>Oryza sativa</i> ]	7e-49
CC0690		330	Gentranskript ohne bekannte Funktion	-
CC0774		667	Protein der Got1 ähnlichen Familie (ABF94577.1) [ <i>Oryza sativa</i> ]	6e-59
CC0690		748	ZmEBE-2 Protein (CAD24798.1) [ <i>Zea mays</i> ]	1e-86
CC0842		404	Bislang unbekannte Sequenz	-
CC0876		386	Putative 3-oxoacyl Synthase I, Chloroplastenvorläufer (BAD35225.1) [ <i>Oryza sativa</i> ]	4e-16
CC0989		403	Protein mit UBX Domäne (ABA92725.2) [ <i>Oryza sativa</i> ]	4e-16
CC0992		644	EREBP-4 ähnliches Protein (XP_467112.1) [ <i>Oryza sativa</i> ]	2e-19
CCEC5D12		400	Gentranskript ohne bekannte Funktion	-
ECCC3B8		290	Gentranskript ohne bekannte Funktion	-
ECCC3G1		669	Putativer Faktor der Auxin-Antwort (AAO34491.1) [ <i>Oryza sativa</i> ]	2e-29
ECCC4C9		692	DNA bindendes Protein (NP_190446.1) [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]	1e-42
ECCC7F9		351	Faktor 16 der Auxin Antwort (AAP54297.2) [ <i>Oryza sativa</i> ]	6e-19

## Fortsetzung der Tabelle 11

Klon	Datenbank-nummer	Länge [bp]	BlastX Sequenzhomologie (Datenbanknummer) <sup>a</sup>	E-Wert
Gene, die von Kooperationspartnern zur Verfügung gestellt wurden				
TO27		762	Ribosomale große Untereinheit der Pseudouridin-Synthase A (YP_261474.1) [ <i>Pseudomonas fluorescens</i> Pf-5]	3e-114
TO37		503	Protein der Per1-ähnlichen Familie (ABB86252.1) [ <i>Solanum tuberosum</i> ]	2e-35
TO88		1024	<sup>a</sup> Gen des Calpain-ähnlichen Protein (dek1) (AY061804.1) [ <i>Zea mays</i> ]	7e-104
TO97	AB194864	628	CCAAT bindender Transkriptionsfaktor (AY087696) ( <i>Arabidopsis thaliana</i> )	2e-10
<i>gln4</i>	n. b.	400	Glutamin-Synthase 4	

Signifikant ( $P \leq 0,05$ ) differentiell exprimierte Klone der subtrahierten cDNA-Banken aus Embryo- und Endospermgewebe, der Eizell- und Zentralzellbanken sowie von Kooperationspartnern zur Verfügung gestellte Gene, die über den Vergleich von sechs *dap* Embryonen der interpool Genotypkombination UH301/UH005 ermittelt wurden; Datenbanknummer (falls vorhanden), Länge der bekannten Sequenz und BlastX Homologie mit E-Wert sind gegeben. Unterstrichene Klone wurden bereits im differentiellen Screening als differentiell exprimiert identifiziert. <sup>a</sup> Ausschließlich eine BlastN Homologie konnte ermittelt werden. <sup>b</sup> Falls anstelle der Originalsequenz eine hochgradig homologe Sequenz für die BlastX Analyse genutzt wurde, so ist deren Datenbanknummer durch → gekennzeichnet. n. b.: nicht bekannt



**Abbildung 22: Funktionelle Klassifizierung der charakterisierten, Heterosis assoziierten Gene in Embryonen**  
74% der 223 differentiell exprimierten Genfragmente waren auf der Basis von Sequenzdaten charakterisierbar. 113 einzigartige Gene der cDNA-Banken aus Embryo- und Endospermgewebe, Eizelle und Zentralzelle sowie dem Zweizellstadium wurden entsprechend der Sequenzhomologie und Klassifizierbarkeit 16 Kategorien zugeordnet.

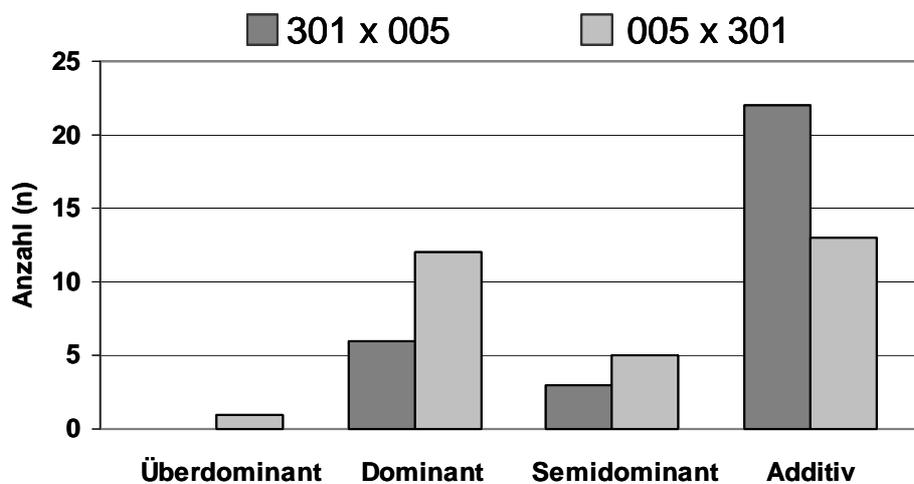
Die funktionelle Klassifikation zeigte, dass die meisten Gene den Kategorien „Transkription“ und „Metabolismus und Energie“ zuzuordnen waren. Diese Kategorien beinhalteten jeweils 28,9% der klassifizierbaren, differentiell exprimierten Gene aus nicht charakterisierten cDNA-Banken. 63,6% der Gene, die sich der Kategorie „Transkription“ zuordnen ließen, zeigten eine Homologie zu Proteinen, die an der transkriptionalen Kontrolle der Genexpression beteiligt sind. 11,8% der Gene aus nicht charakterisierten cDNA-Banken ließen sich jeweils in die Kategorien „Signaltransduktion und zelluläre Kommunikation“ sowie „Proteinschicksal“ einordnen. In die Klassen „DNA Prozessierung“ und „Transponierbare Elemente und virale Proteine“ wurden 5,3% bzw. 7,9% Gene eingestuft.

27,6% der klassifizierbaren, differentiell exprimierten Gene aus nicht charakterisierten cDNA-Banken wiesen eine Homologie zu Proteinen auf, die eine regulatorische Funktion wahrnehmen. Diese insgesamt 21 Gene wurden auf Grund ihrer funktionellen Zugehörigkeit in eine der Kategorien „Zellzyklus“, „Transkription“, „Proteinsynthese“, „Hormonelle Regulation“ oder „DNA Prozessierung“ eingestuft.

### 3.6.2 Heterosis assoziierte Expressionsmuster in sechs dap F1-Embryonen

Auf der Grundlage von Expressionsdaten können statistische Analysen unter Verwendung zweiseitiger studentischer T-Tests durchgeführt werden, um Gene entsprechend des Expressionsverhaltens in reziproken F1-Hybriden und Inzuchtlinien zu klassifizieren und bestimmten Expressionsmustern zuzuordnen.

Bei 31 zufällig ausgewählten Genen, die in den Analysen mit dem Heterosis-3k-Array eine differentielle Expression zeigten, wurde das Expressionsverhalten in sechs dap Embryonen der interpool Genotypkombination UH301/UH005 auf der Basis von qRT-PCR Expressionsdaten überprüft. Diese Gene wiesen unterschiedlichste Homologien bzw. Identitäten auf (Tab. 12). Auf Grund ihres Expressionsverhaltens in reziproken F1-Hybriden und Inzuchtlinien konnten diese Gene verschiedensten Expressionsmustern zugeordnet werden (Abb. 23; Tab. 12).



**Abbildung 23: Nicht additives Expressionsverhalten ist in 6 dap F1-Embryonen vielfach detektierbar**

Überblick über das Expressionsverhalten von 31 als differentiell exprimiert identifizierten und mittels qRT-PCR näher charakterisierten Genen in reziproken sechs dap F1-Embryonen der interpool Genotypkombination UH301/UH005; Additiv: Die Expression gleicht dem Mittel der Eltern. Semidominant: Das Expressionsverhalten ist von additiv verschieden, aber nicht dominant. Dominant: Die Expression gleicht dem höher exprimierenden Elter. Überdominant: Die Expression ist stärker als im höher exprimierenden Elter.

Insgesamt 35 Mal (13x für das Hybrid 005x301, 22x für das reziproke Hybrid 301x005) konnte ein signifikant ( $P \geq 0,15$ ) additives Expressionsverhalten in F1-Embryonen, das von der durchschnittlichen Expression der Inzuchtlinien nicht zu unterscheiden war, festgestellt werden. Ein semidominantes Expressionsverhalten der heterozygoten Nachkommen, das signifikant

( $P \leq 0,15$ ) nicht additiv war, aber nicht die Expressionsstärke des höchst exprimierenden Elter erreichte, wurde acht Mal detektiert. Das Hybrid 301x005 zeigte dieses Expressionsverhalten bei drei Genen, während für das reziproke Hybrid 5 Mal ein solches Expressionsmuster nachgewiesen wurde. Ein signifikant ( $P \leq 0,15$ ) dominantes Expressionsmuster, das dadurch gekennzeichnet ist, dass das Hybrid das gleiche Expressionsniveau erreicht wie die höchst exprimierende Inzuchtlinie, konnte 18 Mal (301x005: 6x, 005x301: 12x) nachgewiesen werden. Eine im Vergleich zu beiden Inzuchtlinien erhöhte Expression (Überdominanz) war für ein Gen im Hybrid 005x301 feststellbar.

**Tabelle 12: Expressionsverhalten von 31 differentiell exprimierten Genen in reziproken 6 dap F1-Embryonen**

Gen	Expressionsverhalten		Identität bzw. Homologie <sup>a</sup>
	301x005	005x301	
BA7	ad	ad	Protein ähnlich einem Transkriptionsfaktor (BAD73738.1) [ <i>Oryza sativa</i> ], 6e-41
CC0447	semi	semi	Putativer plastidärer ATP/ADP Transporter (BAD68020.1) [ <i>Oryza sativa</i> ], 2e-32
CC0622	ad	dom	Adenosin-Kinase (CAB40376.1) [ <i>Zea mays</i> ], 2e-79
CG8	ad	ad	Gentranskript ohne bekannte Funktion
CH4	ad	dom	Chromatin remodulierender Faktor CHD3 (AAL47211.1) [ <i>Oryza sativa</i> ], 6e-61
DH2	dom	dom	Protein ähnlich der Proteinkinase MSK-3 (CAB87631.1) [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ], 2e-61
EC1	dom	semi	Gentranskript ohne bekannte Funktion
EH2	ad	dom	Putatives Zellkernprotein P120 in proliferierenden Zellen (BAD12915.1) [ <i>Oryza sativa</i> ], 3e-36
FB10	ad	ad	Unbekanntes Protein (XP_469322.1) [ <i>Oryza sativa</i> ], 4e-27
FC11	ad	ad	Phragmoplast assoziiertes Kinesin verwandtes Protein 1 (AAF78897.1) [ <i>Oryza sativa</i> ], 1e-133
FF8	ad	semi	(→ DV492610.1) Putative Helikase (AAM76346.1) [ <i>Oryza sativa</i> ], 4e-36
GC10	semi	semi	Gentranskript ohne bekannte Funktion
GD8	semi	semi	(→ AY107974.1) RNA Polymerase Rpb1 (ABA91105.2) [ <i>Oryza sativa</i> ], 5e-09
HC11	ad	ad	Nucleosomen / Chromatin assemblierender Faktor C (AF384037.1) [ <i>Zea mays</i> ], 0.0
HE2	ad	dom	Putatives Protein mit Sec63 Domäne (XP_469692.1) [ <i>Oryza sativa</i> ], 7e-48
IE11	ad	ad	Katalytische Proteinphosphatase Type 2C (NP_174731.1) [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ], 5e-57
JC1	ad	dom	(→ CO447404.1) Putatives RING-H2 Zink-Finger Protein (AAP85546.1) [ <i>Oryza sativa</i> ], 4e-09
JD10	ad	ad	Protein, das in Gehirn und reproduktiven Organen exprimiert wird (BAD53578.1) [ <i>Oryza sativa</i> ], 1e-89
KG9	dom	dom	Putative Diphosphat-Fruktose-6-Phosphat 1-Phosphotransferase alpha Kette (XP_467453.1) [ <i>Oryza sativa</i> ], 2e-123
LB7	ad	ad	Protein, das einen ACT Bereich enthält (ABA95833.1) [ <i>Oryza sativa</i> ], 3e-76
LC1	dom	dom	Protein ähnlich der alpha Keto-Säure Dehydrogenase E1 alpha Untereinheit (ABA95971.1) [ <i>Oryza sativa</i> ], 9e-36
MA7	ad	überdom	Putativer Translationsinitiationsfaktor eIF-2B epsilon Untereinheit (BAD22043.1) [ <i>Oryza sativa</i> ], 1e-122
OA5	ad	ad	Putative S ähnliche RNase (BAD82178.1) [ <i>Oryza sativa</i> ], 4e-57
QF8	ad	ad	Putativer TAF5 (BAD37340.1) [ <i>Oryza sativa</i> ], 4e-170
<i>Reina</i>	ad	ad	TY3-Klasse Retrotransposon [ <i>Zea mays</i> ] (Avramova <i>et al.</i> , 1996)
SA11	ad	dom	Putative CBL interagierende Proteinkinase 1 (BAA96628.1) [ <i>Oryza sativa</i> ], 5e-25
<i>sdg130</i>	ad	ad	SET Proteine mit den Proteindomänen zf-MYND und SET
<i>set129</i>	ad	ad	SET Proteine mit SET Domäne
TC5	dom	dom	Zellwandprotein (M36912.1) [ <i>Zea mays</i> ], 0.0
TF6	dom	dom	Protein ähnlich dem Protein mit HGWP Wiederholungen (BAD36117.1) [ <i>Oryza sativa</i> ], 8e-63
TO97	ad	dom	CCAAT bindender Transkriptionsfaktor (AY087696) ( <i>Arabidopsis thaliana</i> )

Signifikantes ( $P \leq 0,15$ ;  $P \geq 0,15$ ) Expressionsverhalten von 31 zufällig ausgewählten, differentiell exprimierten Genen in reziproken sechs dap F1-Embryonen der interpool Genotypkombination UH301/UH005; Expressionsverhalten jedes F1-Genotyps und Sequenzhomologie bzw. Identität sind gegeben. Die Klassifizierung des Expressionsverhaltens wurde auf der Basis von qRT-PCR Expressionsanalysen mit Hilfe von zweiseitigen studentischen T-Test durch die Überprüfung der Hypothesen A)  $H_0: H = (P_1 + P_2)/2$  und B)  $H_0: H = P_B$  vorgenommen. ad: additiv (Die Expression gleicht dem Mittel der Eltern.  $H = (P_1 + P_2)/2$ ); semi: semidominant (Das Expressionsverhalten ist von additiv verschieden, aber nicht dominant.  $H \neq (P_1 + P_2)/2 \cap H \neq P_B \cap H - P_B < 0$ ); dom: dominant (Die Expression gleicht dem höher exprimierenden Elter.  $H \neq (P_1 + P_2)/2 \cap H = P_B$ ); überdom: überdominant (Die Expression ist stärker als im stark exprimierenden Elter.  $H \neq (P_1 + P_2)/2 \cap H \neq P_B \cap H - P_B > 0$ )

<sup>a</sup> Falls anstelle der Originalsequenz eine hochgradig homologe Sequenz für die BlastX Analyse genutzt wurde, so ist deren Datenbanknummer durch → gekennzeichnet.

Insgesamt konnte in 43,5% der Fälle ein signifikant ( $P \leq 0,15$ ) nicht additives Expressionsverhalten in sechs *hap* F1-Embryonen der Genotypkombination UH301/UH005 nachgewiesen werden, wobei die Genexpression im 005x301 Hybrid sehr viel häufiger (56,3%) als im Hybrid 301x005 (28,1%) nicht dem elterlichen Durchschnitt entsprach (Abb. 23).

Bei acht der 31 untersuchten Gene wiesen beide F1-Hybride das gleiche nicht additive Expressionsmuster auf. Diese acht Gene sind in Bezug auf ihre Sequenzhomologie zu bekannten Proteinen der Datenbanken sehr verschieden (Tab. 12). Während die Gene KG9, LC1 und CC0447 aufgrund ihrer Homologie mit dem Primärmetabolismus in Zusammenhang gebracht werden konnten, zeigten die Gene DH2, GD8 und TF6 eine Homologie zu einer Proteinkinase, einer RNA-Polymerase bzw. zu einem Protein, das mit Transposition in Verbindung steht. Für das Gen GC10 konnte keine Homologie zu einem bekannten Protein mittels BlastX Analyse gefunden werden.

Für neun Gene konnte nur im 005x301 F1-Hybrid eine nicht additive Expression festgestellt werden. Zu diesen gehörten das überdominant exprimierte Gen MA7, die im Hybrid 005x301 dominant exprimierten Gene EH2, TO97, SA11, CH4, CC0622, JC1 und HE2 sowie das semidominant exprimierte Gen FF8. Nahezu allen gemeinsam war die Homologie zu Proteinen mit einer putativ regulierenden Funktion (Tab. 12).

### **3.7 Allelspezifische Expressionsanalysen in verschiedenen embryonalen Entwicklungsstadien**

Ziel dieser Expressionsanalysen war es, Informationen zur Regulation der differentiellen Expression in der frühen Embryonalentwicklung von Mais zu erhalten. Ferner sollten die Analysen Aufschluss über die für Heterosis essentielle paternale Genomaktivierung bringen.

Aus diesem Grund wurde die Bestimmung der relativen Häufigkeit allelspezifischer Transkripte sowohl bei sechs und acht *hap* Hybridembryonen als auch bei Zygoten und drei *hap* Hybridembryonen der interpool Genotypkombination UH301/UH005 vorgenommen.

Um parentale Effekte von allelspezifischen Regulationseffekten, die auf die *cis*-regulatorischen Elemente der zwei untersuchten Genotypen zurückzuführen sind, zu trennen, wurden beide reziproken Hybride (301x005, 005x301) in den jeweiligen Entwicklungsstadien analysiert.

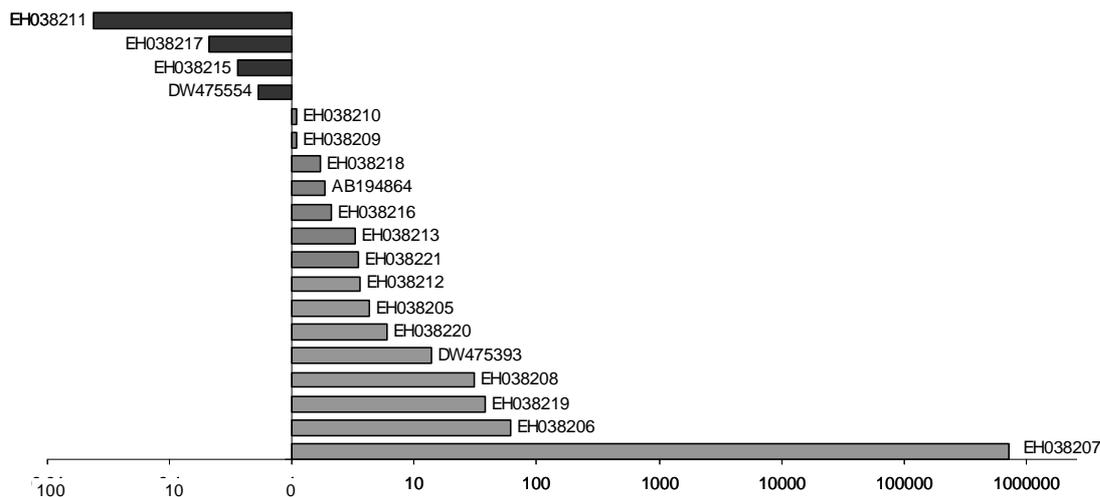
Die Analysen wurden mit Hilfe polymorpher Genorte, einer PCR basierten Methode zur Generierung von allelspezifischen Nukleotidsequenzen und „Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight“ (MALDI-TOF) Massenspektrometrie für 20 ausgewählte Gene durchgeführt.

#### **3.7.1 Auswahl und Charakterisierung der allelspezifisch zu untersuchenden Gene**

Die Auswahl der zu untersuchenden Gene basierte auf den Microarrayanalysen, die die Identifikation von Heterosis assoziierter Genexpression in sechs *hap* Embryonen der interpool Kreuzung UH301/UH005 zum Ziel hatten (Kapitel 3.5). qRT-PCR wurde für die weiterführende Charakterisierung der Expression verschiedener Gene in sechs *hap* Embryonen der Inzuchtlinien

UH301 und UH005 genutzt. Um in der Untersuchung nicht nur eine bestimmte Gruppe von Genen mit beispielsweise einer Tendenz zu allelspezifischen, regulatorischen Effekten zu analysieren, wurden 20 Gene mit unterschiedlich differentiellen bis fast gleichen Expressionsniveaus zwischen den Genotypen UH301 und UH005 ausgewählt (Tab. 13; Abb. 24; Kapitel 7.1: Tab. 15).

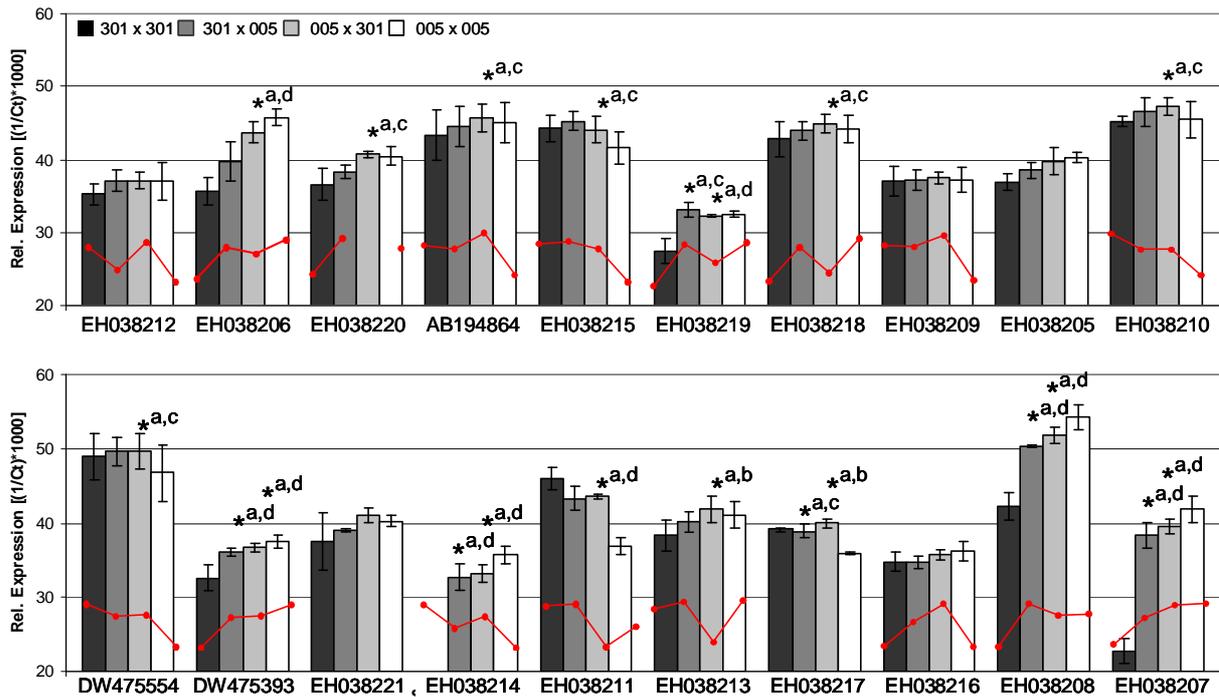
PCR-Analysen zur Genexpression der 20 ausgewählten Gene zeigten, dass alle Gene sowohl in den zu untersuchenden Entwicklungsstadien als auch in unbefruchteten Kolben, sechs dap Endosperm, Keimlingen, Blatt und Wurzel exprimiert werden (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 24: Allelspezifisch untersuchte Gene zeigen unterschiedlich diff. Expression in UH301 und UH005**  
Mittels qRT-PCR detektierte Expressionsunterschiede der 20 Gene, die für die allelspezifischen Expressionsanalysen ausgewählt wurden, in den Inzuchtlinien UH301 und UH005; Graue Balken geben die erhöhte Expression in der Inzuchtlinie UH005, schwarze Balken die in der Inzuchtlinie UH301 wieder. OC8 konnte aufgrund fehlenden Expression in UH301 nicht dargestellt werden.

Für die vergleichende Charakterisierung der Genexpressionsniveaus der ausgewählten Gene in sechs dap F1-Hybrid- und Inzuchtembryonen der interpool Kreuzung UH301/UH005 wurden umfangreiche qRT-PCR Analysen durchgeführt und statistisch ausgewertet (Abb. 25).

In Hybriden konnte 19 Mal ein additives Expressionsverhalten nachgewiesen werden, wobei die Expression der Gene EH038209, EH038221, EH038205, EH038216 und EH038212 in beiden reziproken Hybriden (301x005 und 005x301) gleichermaßen vom elterlichen Durchschnitt nicht zu unterscheiden war. 21 Mal konnte in den F1-Embryonen eine signifikant ( $P \leq 0,15$ ) nicht additive Genexpression festgestellt werden. Bei den Genen EH038219, DW475393, EH038214, EH038217, EH038207 und EH038208 zeigten beide reziproken Hybriden eine vom elterlichen Durchschnitt abweichenden Expression. Ein ( $P \leq 0,15$ ) signifikant semidominantes Expressionsverhalten, das einer erhöhten, aber nicht dominanten Expression entspricht, ließ sich 11 Mal detektieren. Die Expression der Gene EH038207, EH038208, EH038214 und DW475393 war in jeweils beiden reziproken F1-Hybriden semidominant. Acht Mal konnte eine dominante Expression in F1-Embryonen festgestellt werden. Das Hybrid 005x301 zeigte sowohl für das Gen EH038213 als auch für das Gen EH038217 ein signifikant ( $P \leq 0,15$ ) überdominantes Expressionsverhalten.



**Abbildung 25: Expressionsmuster der allelspezifisch untersuchten Gene in 6 dap Embryonen**

Durch qRT-PCR ermittelte relative Expression der allelspezifisch untersuchten Gene in sechs dap Embryogewebe der interpool Genotypkombination UH301/UH005; Die Expressionsniveaus der unterschiedlichen Genotypen sind entsprechend der Legende farblich gekennzeichnet. Fehlerbalken geben die Standardabweichung wieder. Die rote Kurve jedes Expressionsmusters zeigt die über Microarrayanalysen ermittelten Expressionsdaten für jeden Genotyp. Mit Hilfe von zweiseitigen studentischen T-Test, mit denen die Hypothesen A)  $H_0: H=(P_1+P_2)/2$  und B)  $H_0: H=P_B$  überprüft wurden, erfolgte die Klassifikation des Expressionsverhaltens in F1-Embryonen: \*<sup>a</sup> signifikant ( $P \leq 0,15$ ) nicht additive Expression ( $H \neq (P_1+P_2)/2$ ), \*<sup>c</sup>: signifikant ( $P \geq 0,15$ ) dominante Expression ( $H \neq (P_1+P_2)/2 \cap H=P_B$ ), \*<sup>d</sup>: signifikant ( $P \leq 0,15$ ) semidominante Expression ( $H \neq (P_1+P_2)/2 \cap H \neq P_B \cap H-P_B < 0$ ), \*<sup>b</sup>: signifikant ( $P \leq 0,15$ ) überdominante Expression ( $H \neq (P_1+P_2)/2 \cap H \neq P_B \cap H-P_B > 0$ )

Für eine weiterführende Charakterisierung wurden die Gensequenzen der 20 ausgewählten Gene mit Eintragungen von Nukleotid- und Proteinsequenzen in den Datenbanken verglichen (Tab. 13). Die Sequenzen von 5 Genen zeigten keine Homologie zu Datenbankeinträgen, während 15 Gene zu Proteinen mit unterschiedlichen Funktionen homolog waren. Einige dieser Proteine sind beteiligt am zellulären Transport, am Aminosäuremetabolismus oder an der Translation. Andere kodieren für ein putatives Signaltransduktionsprotein oder einen Chromatin remodulierenden Faktor.

Für acht der 20 ausgewählten Gene konnte eine chromosomale Lokalisierung auf der Basis einer hohen Homologie in BlastN Analysen zu Sequenzen von „bacterial artificial chromosomes“ (BAC) der Maisinzuchtlinie B73, deren chromosomale Anordnung bekannt ist, bestimmt werden. Diese acht Gene konnten fünf der 10 Chromosomen von *Zea mays* zugeordnet werden (Tab. 13). Ferner konnten für die ausgewählten 20 Gene geeignete Polymorphismen, bei denen es sich je nach Gen um Einzel- oder Mehrfachnukleotidaustausche oder Insertionen bzw. Deletionen von Nukleotiden handelt, für eine Unterscheidung der Allele identifiziert werden.

Tabelle 13: Charakterisierung der allelspezifisch untersuchten Gene auf der Basis von Sequenzhomologien

Datenbank-Nr.	BlastX Sequenzhomologie <sup>a</sup> (Datenbanknummer)	E Wert	Lokalisierung <sup>b</sup>
EH038207	Keine Sequenzhomologie	-	Chromosom 4
EH38206	(→ DV492610.1) Putative Helikase (AAM76346.1) [ <i>Oryza sativa</i> ]	4e-36	-
EH038219	Keine Sequenzhomologie	-	-
EH038208	(→ AY107974.1) RNA Polymerase Rpb1 (ABA91105.2) [ <i>Oryza sativa</i> ]	5e-09	Chromosom 5
DW475393	Plastidischer ATP/ADP Transporter [ <i>Oryza sativa</i> ] (AAX58120.1)	2e-32	-
EH038220	Putatives Zellkernprotein P120 in proliferierenden Zellen (BAD12915.1) [ <i>Oryza sativa</i> ]	3e-36	Chromosom 4
EH038205	Mitochondrialer Elongationsfaktor G (AAK53868.1) [ <i>Oryza sativa</i> ]	8e-160	-
EH038221	(→ CF636186.1) Bindung von Nukleotiden (NP189852.1) [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]	9e-04	-
EH038213	Putativer Translationsinitiationsfaktor eIF-2B epsilon Untereinheit (BAD22043.1) [ <i>Oryza sativa</i> ]	1e-122	-
EH038212	Protein, das einen ACT Bereich enthält (ABA95833.1) [ <i>Oryza sativa</i> ]	3e-76	-
EH038216	Keine Sequenzhomologie	-	Chromosom 4
AB194864	CCAAT bindender Transkriptionsfaktor der Familie Untereinheit B (ABA99882.1) [ <i>Oryza sativa</i> ]	5e-27	-
EH038218	Chromatin remodelierender Faktor CHD3 (AAL47211.1) [ <i>Oryza sativa</i> ]	2e-60	-
EH038214	NAM ähnliches Protein (BAD37987.1) [ <i>Oryza sativa</i> ]	4e-22	-
EH038209	Protein, das in Gehirn und reproduktiven Organen exprimiert wird (BAD53578.1) [ <i>Oryza sativa</i> ]	1e-89	-
EH038210	(→ CO447404.1) Putatives RING-H2 Zink-Finger Protein (AAP85546.1) [ <i>Oryza sativa</i> ]	4e-09	Chromosom 2
DW475554	Adenosinkinase (CAB40376.1) [ <i>Zea mays</i> ]	2e-52	Chromosom 2
EH038215	Putative CBL interagierende Proteinkinase 1 (BAA96628.1) [ <i>Oryza sativa</i> ]	5e-25	Chromosom 3
EH038217	Keine Sequenzhomologie	-	Chromosom 8
EH038211	Keine Sequenzhomologie	-	-

BlastX Sequenzhomologie und Lokalisierung der allelspezifisch untersuchten Gene; <sup>a</sup> Falls anstelle der Originalsequenz eine hochgradig homologe Sequenz für die BlastX Analyse genutzt wurde, so ist deren Datenbanknummer durch → gekennzeichnet. <sup>b</sup> Chromosomale Lokalisierung auf der Basis hoher Homologie in einer BlastN Analyse zu BAC-Sequenzen der Maisinzuchtlinie B73, deren chromosomale Zuordnung bekannt ist, E Wert < 1e<sup>-42</sup>

### 3.7.2 Expressionsregulation in sechs und acht dap F1-Embryonen

Die für sechs dap F1-Hybride nachgewiesenen Expressionsmuster (Kapitel 3.7.1) sind Folge einer durch *cis*-Variationen und/oder *trans*-Faktoren beeinflussten Genregulation. Mit Hilfe der allelspezifischen Expressionsanalyse kann unterschieden werden, ob in *trans* wirkende Faktoren oder *cis*-Variationen der Inzuchtlinien die Regulation in der Filialgeneration bestimmen.

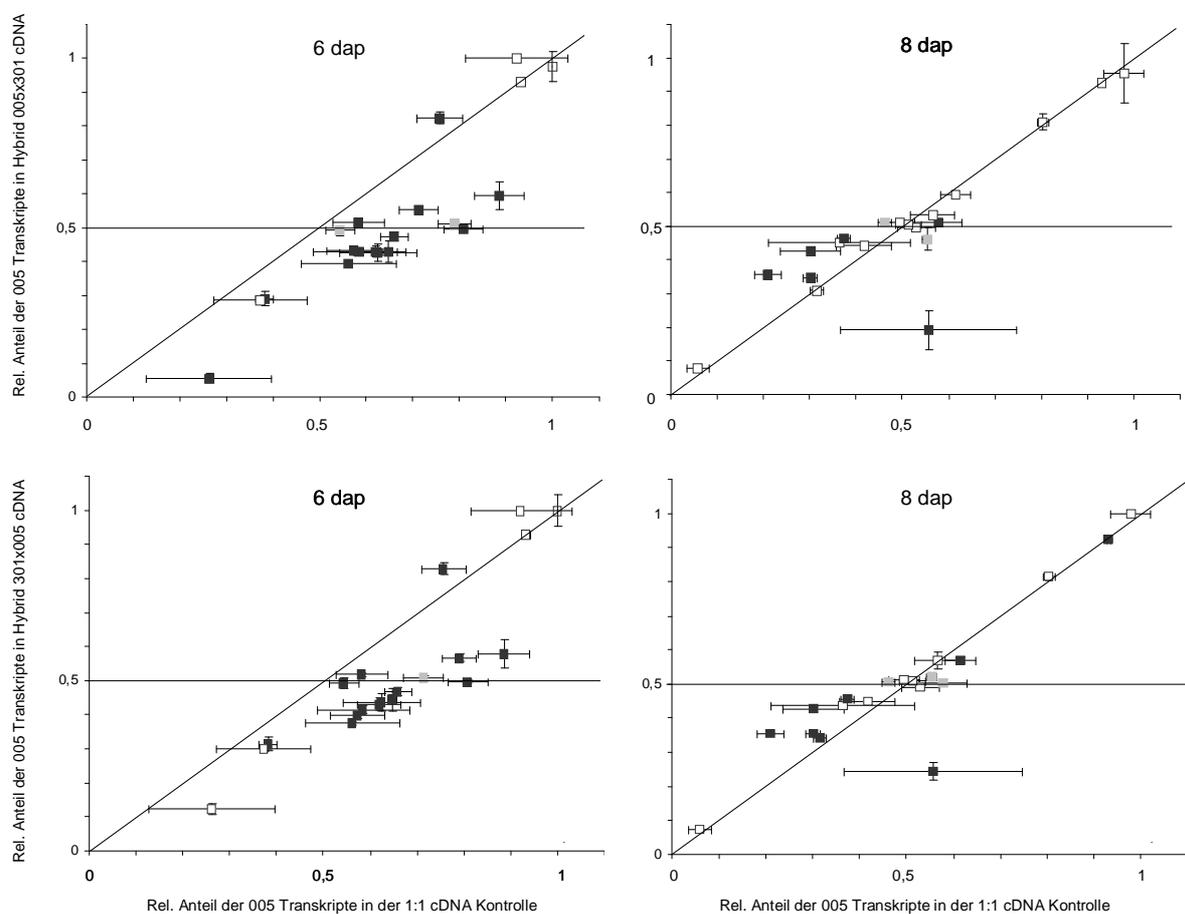
Ein Gen, das in F1-Hybriden das gleiche allelische Expressionsverhältnis aufweist wie in der 1:1 cDNA-Mischung der Inzuchtlinien, ist ausschließlich *cis*-reguliert (Wittkopp, 2004; Stupar und Springer, 2006). Eine *trans*-Regulation ist nach Stupar und Springer (2006) dann in der Filialgeneration feststellbar, wenn die Expressionsverhältnisse der Allele in der F1-Generation keine Übereinstimmung zu der 1:1 cDNA Mischung zeigen, aber dem allelischen Verhältnis in gDNA (Ratio der Allele = 1) gleichen. Ist die Ratio der Allele in F1-Embryonen von eins verschieden und keine ausschließliche *cis*-Regulation signifikant feststellbar, so nehmen beide Regulationsarten (*cis/trans*) auf die allelische Expression im F1-Hybrid Einfluss (Stupar und Springer, 2006). Zweiseitige studentische T-Tests wurden genutzt, um signifikante ( $P \leq 0,05$ ) Unterschiede zwischen der relativen Transkripthäufigkeit des 005 Allels in Hybrid-cDNA und der 1:1 cDNA-Mischung bzw. der gDNA-Probe aufzuzeigen. Auf der Basis dieser statistischen Analysen konnte für jedes untersuchte Gen die in den reziproken Hybriden vorherrschende Regulation ermittelt werden (Abb. 26; Kapitel 7.1: Tab. 18).

Von den 20 untersuchten Genen wurden im sechs dap 301x005 Hybrid fünf Gene als ausschließlich *cis*-reguliert, ein Gen als *trans*-reguliert und 13 Gene als *cis/trans*-reguliert eingestuft. Bei vier Genen des sechs dap Hybrids 005x301 wurde eine *cis*-Regulation, bei zwei

Genen eine *trans*-Regulation und bei ebenfalls 13 Genen eine kombinierte *cis/trans*-Regulation festgestellt. Ein Gen konnte auf Grund fehlender gDNA-Werte in beiden Hybriden nur als nicht ausschließlich *cis*-reguliert klassifiziert werden.

In acht dap F1-Embryonen wurde folgende Regulation nachgewiesen: Neun der 20 Gene konnten im 301x005 Hybrid als ausschließlich *cis*-reguliert eingestuft werden, drei Gene als *trans*-reguliert und acht Gene als *cis/trans*-reguliert. Im 005x301 Hybrid wurden insgesamt 11 Gene als ausschließlich *cis*-reguliert, zwei Gene als *trans*-reguliert und sechs Gene als *cis/trans*-reguliert klassifiziert.

Die Untersuchungen zeigten, dass die reziproken F1-Hybride eine ähnliche Regulation der Genexpression aufwiesen. Eine für beide Hybride nahezu gleiche Anzahl an Genen konnte in den unterschiedlichen Entwicklungsstadien (sechs dap/acht dap) den jeweiligen Regulationsarten zugeordnet werden.

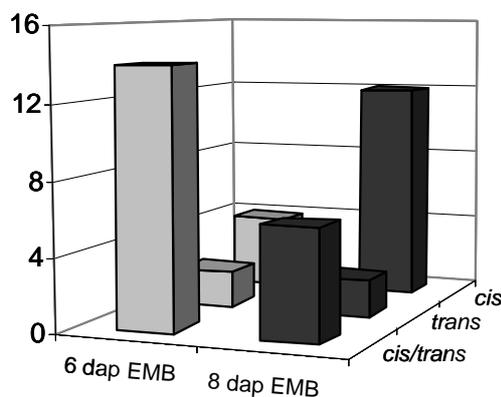


**Abbildung 26: Unterschiedliche Regulationseinflüsse in sechs und acht dap F1-Embryonen**

Die relative Häufigkeit des 005 Allels in cDNA-Proben von sechs und acht dap F1-Embryonen (Y-Achse) wurde gemeinsam mit der relativen Häufigkeit des 005 Allels in Proben, die durch 1:1 Mischungen der Inzucht-cDNAs entstanden, (X-Achse) aufgetragen. Die Fehlerbalken geben das 95% Konfidenzintervall wieder. Durch statistische Analysen auf der Basis von zweiseitigen studentischen T-Tests nach Stupar und Springer (2006) konnte die Regulationsart für die untersuchten Gene als signifikant ( $P \leq 0,05$ ) ermittelt werden. Entsprechend der Regulation erfolgte die farbliche Kennzeichnung in den Diagrammen. *Cis* ( $H=1:1$ Mischung): weiß; *trans* ( $H \neq 1:1$ Mischung  $\cap$   $H=gDNA$ ): grau; *cis/trans* ( $H \neq 1:1$ Mischung  $\cap$   $H_0: H \neq gDNA$ ): schwarz. Die horizontale Linie weist auf die erwartete Lokalisierung von *trans*-regulierten Genen hin, während die winkelhalbierende Linie die erwartete Lokalisierung von *cis*-regulierten Genen andeutet.

Die Lokalisierung der meisten *cis/trans*-regulierten Gene in Abbildung 26 nahe der horizontalen Linie wies den starken Einfluss der *trans*-Regulation in sechs dap Embryonen nach. Eine vornehmlich *cis*-regulatorisch geprägte Expression konnte in acht dap Embryonen durch die nähere Lokalisierung der Gene an der Winkelhalbierenden festgestellt werden (Abb. 26).

Durch die allelspezifischen Expressionanalysen konnte nachgewiesen werden, dass die Genexpression in acht dap Embryonen im Zuge einer veränderten Regulation erfolgte. Während in sechs dap Embryonen die meisten Gene als *cis/trans*-reguliert eingestuft wurden, konnte in acht dap Embryonen vorherrschend die *cis*-regulierte Expression festgestellt werden (Abb. 27).



**Abbildung 27: Regulationsumstellung in F1-Embryonen**  
Gegenüberstellung der Regulationsmechanismen für 20 Gene in sechs und acht Tage alten 005x301 Hybrid-embryonen

In sechs dap Embryonen konnten durch die Zusammenführung der Daten zum Expressionsverhalten der Hybride im Vergleich zu den elterlichen Inzuchtlinien und zur allelspezifischen Expression in Hybriden Hinweise auf die Steuerung der Genexpression unter heterozygoten Bedingungen gewonnen werden (Tab. 14).

Die signifikante Überdominanz der Gene EH038213 und EH038217 im 005x301 Hybriden konnte in Zusammenhang gebracht werden mit einer *cis/trans*-Regulation. Ein dominantes Expressionsverhalten wurde bei 75% der untersuchten Gene in Kombination mit einer *cis/trans*-regulierten Expression beobachtet, obwohl auch eine *cis*- oder *trans*-Regulation bei dominant exprimierten Genen vorgefunden wurde. Auffällig war, dass das dominante Expressionsverhalten im 005x301 Hybrid im Vergleich zum reziproken Hybrid häufiger nachgewiesen werden konnte und die dominant exprimierten Gene in diesem Hybrid als ausschließlich *trans*- oder *cis/trans*-reguliert eingestuft wurden. Eine semidominante Expression wurde bei den untersuchten Genen gemeinsam mit einer ausschließlich *cis*- bzw. *cis/trans*-regulierten Expression festgestellt. Ein additives Expressionsverhalten konnte in den Hybriden vornehmlich bei Genen nachgewiesen werden, die als *cis/trans*-reguliert eingestuft wurden. Bei zwei Genen wurde ein additives Expressionsmuster in Kombination mit einer *cis*-Regulation nachgewiesen. Zwei weitere Gene zeigten ein additives Expressionsverhalten und wurden in den entsprechenden Hybriden als *trans*-reguliert klassifiziert.

Tabelle 14: Steuerung der Genexpression unter heterozygoten Bedingungen

Expressionsverhalten der Hybride im Vergleich zu den Elternlinien <sup>a</sup>	Allelische Regulation unter Hybridbedingungen <sup>b</sup>		
	<i>cis</i>	<i>trans</i>	<i>cis/trans</i>
Überdominant			(0/2)
Dominant	(1/0)	(0/1)	(1/5)
Semidominant	(2/4)		(2/3)
Additiv	(2/0)	(1/1)	(11/4)

Kombinierte Darstellung der qRT-PCR Ergebnisse <sup>a</sup> und der Erkenntnisse, die über allelspezifische Expressionsanalysen <sup>b</sup> gewonnen wurden; In den Klammern ist die Anzahl der Gene, die in den reziproken Hybriden der interpool Genotypkombination UH301/UH005 eine entsprechend regulierte Expression zeigte, getrennt (301x005/005x301) aufgeführt.

### 3.7.3 Paternale Genomaktivierung und allelspezifische Genexpression im Embryo

Um zu zeigen, wann die für Heterosis unverzichtbare paternale Genomaktivierung vollzogen wird, wurden allelspezifische Expressionsanalysen durchgeführt. Die Untersuchungen basierten auf ein *dap* Zygoten (vor der ersten Zellteilung), drei *dap* Proembryonen (8 bis 16 Zellen) und sechs *dap* Embryonen des Transitionsstadiums (einige hundert Zellen), die vollständig von dem umgebenden mütterlichen Gewebe (Abb. 29A) mittels Mikrodissektionstechnik getrennt wurden.

Für alle der insgesamt 20 untersuchten Gene konnten in der Zygote Transkripte der paternalen Allele nachgewiesen werden (Abb. 29B; Kapitel 7.1: Tab. 17).

Vier Gene (DW475393, EH038319, EH038217, and EH038211) zeigten die vorwiegende Expression nur eines Allels unabhängig vom elterlichen Ursprung in Zygoten und in Hybridembryonen der frühen Entwicklung. Bei zwei Genen (EH038207, EH038206), die zwischen den elterlichen Inzuchtlinien die stärkste differentielle Expression zeigten, wurde in beiden reziproken Hybriden zu allen untersuchten Zeitpunkten der Entwicklung die ausschließliche Expression des Allels UH005 unabhängig vom elterlichen Ursprung nachgewiesen.

Durch den Vergleich der allelspezifischen Transkripthäufigkeiten in den reziproken Hybriden, die abgesehen vom elterlichen Ursprung der Allele genetisch identisch sind, konnten elterliche Effekte, die auf das relative Transkriptniveau Einfluss nehmen, abgeleitet werden. Beispielsweise würde eine ausschließliche Expression des jeweiligen mütterlichen Allels in beiden reziproken Hybriden auf einen 100% mütterlichen Effekt verweisen, während eine vollkommen gleichartige Expression der Allele in den reziproken Hybriden zeigt, dass kein elterlicher Effekt auf die Transkription Einfluss nimmt.

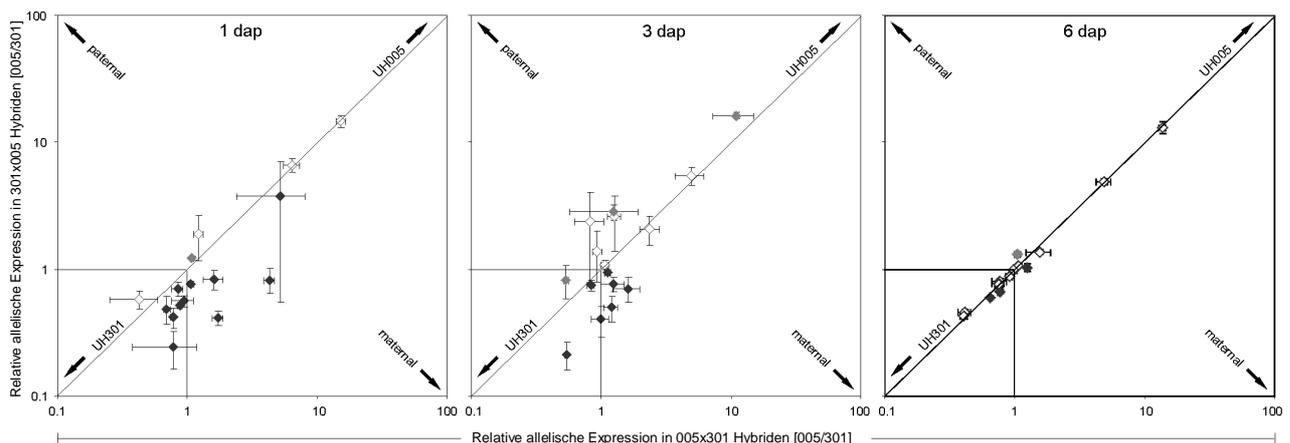
In Zygoten konnte bei sieben der 20 untersuchten Gene kein signifikanter Einfluss durch den elterlichen Ursprung festgestellt werden, während bei 12 Genen die Transkripthäufigkeit signifikant ( $P \leq 0,05$ ) maternalen Effekten unterlag. Eine maternale Einflussnahme von 4,7% bis 37,4% wurde nachgewiesen, die im Durchschnitt 19,6% betrug. Für das Gen EH038221 war eine

signifikant ( $P \leq 0,05$ ) erhöhte Transkripthäufigkeit (3,2%) des väterlichen Allels in beiden untersuchten Hybriden feststellbar.

Drei Tage nach der Bestäubung war bei acht Genen eine erhöhte maternale Transkripthäufigkeit signifikant ( $P \leq 0,05$ ) nachweisbar, die im Mittel auf einem 15,4% maternalen Effekt verwies. Bei drei Genen (EH038216, EH038208, DW475393) konnte in drei dap Embryonen eine signifikant ( $P \leq 0,05$ ) erhöhte väterliche Transkriptmenge detektiert werden. Der durchschnittliche väterliche Effekt betrug 13,6%. Neun Gene zeigten keinerlei signifikante elterliche Präferenz in der Transkripthäufigkeit.

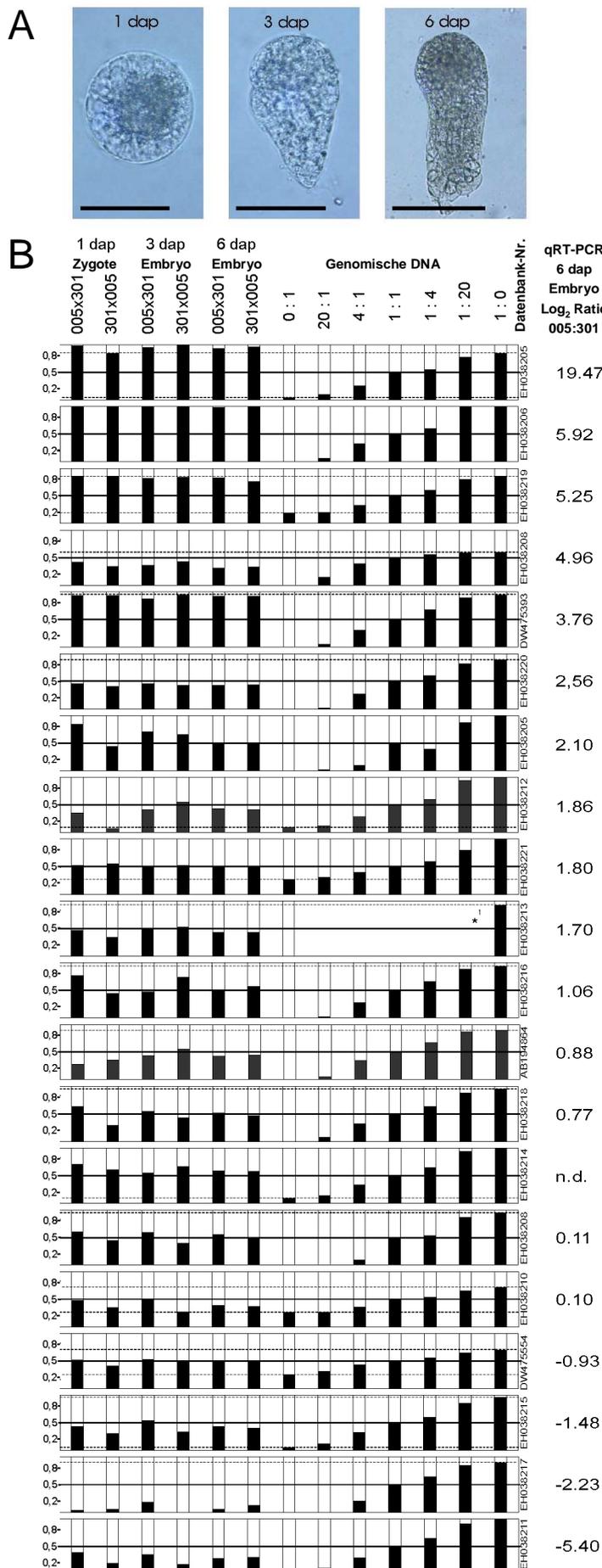
In sechs dap Embryonen wurden drei Gene (EH038210, EH038209 und EH038215) durch einen mittleren maternalen Effekt von 3,3% signifikant ( $P \leq 0,05$ ) beeinflusst, während für die Genexpression von 15 Genen keinerlei elterliche Einflussnahme nachweisbar war. Zwei Gene (EH038216 und EH038217) zeigten im Durchschnitt eine signifikante ( $P \leq 0,05$ ) 6,2% Beeinflussung durch paternale Effekte.

Abbildung 28 fasst die zuvor beschriebene Genomaktivität in ein, drei und sechs dap Embryonen zusammen.



**Abbildung 28: Gleichwertige elterliche Genomaktivität in der frühen Embryonalentwicklung**

Relative allelische Expressionsverhältnisse von F1-Hybriden des Genotyps 301x005 (005/301, Y Achse) sind gegen die relativen allelischen Expressionsverhältnisse des reziproken F1-Hybriden 005x301 (005/301, X Achse) aufgezeichnet. Die Expressionsverhältnisse sind auf einer logarithmischen Skala zusammen mit Fehlerbalken, die das 95% Konfidenzintervall aufzeigen, aufgetragen.  $005/301 = 1$  bedeutet identische Expression beider Allele; die  $y=x$  Linie kennzeichnet das elterlich unbeeinflusste Verhältnis. Maternale oder paternale Effekte führen zu einer in der Richtung entgegengesetzten Abweichung von der  $y=x$  Linie (siehe Pfeile). Die Ablenkung von  $y=x=1$  entlang der  $y=x$  Linie spezifiziert eine allelische Präferenz, die ebenfalls durch Pfeile kenntlich gemacht ist. Die farbliche Kennzeichnung der Quadrate bezieht sich auf die in T-Tests festgestellte Signifikanz.  $H_0$ : Allel005 (301x005) = Allel005 (005x301): keine verstärkte Einflussnahme durch einen Elter, weiß; größere Einflussnahme durch den Vater ( $P < 0,05$ ), grau; größere Einflussnahme durch die Mutter ( $P < 0,05$ ), schwarz. Die vier Gene EH038212, EH038217, EH038207, EH038206 konnten auf Grund einer mindestens einmaligen monoallelischen Expression nicht dargestellt werden.



**Abbildung 29: Allelspezifische Expressionsanalyse in F1-Embryonen der frühen Entwicklung**

A) Ein, drei und sechs dap 005x301 Embryonen, die für die allelspezifischen Expressionsanalysen vom umliegenden Gewebe durch Mikrodissektion frei präpariert wurden B) Relative allelspezifische Expressionsniveaus von ein, drei und sechs dap reziproken F1-Hybriden, die aus Kreuzungen der Inzuchtlinien UH301 und UH005 hervorgegangen sind; gDNA der Inzuchtlinien UH301 und UH005 in unterschiedlichen Mischungsverhältnissen [1:0, 20:1, 4:1, 1:1, 1:4, 1:20, 0:1] und gDNA des Hybrids 301x005 [allelisches Verhältnis 1:1] zeigten in jeder Einzeluntersuchung das Expressionsverhältnis der Allele und die Detektionsgrenzen auf. Die durchgezogene Linie hebt das 1:1 Verhältnis hervor. Expressionsunterschiede zwischen den Inzuchtlinien UH301 und UH005, die in sechs dap Embryonen mittels qRT-PCR ermittelt wurden, sind über log<sub>2</sub> Ratio [005:301], angegeben. Die Datenbanknummer der untersuchten Gene ist neben dem Expressionsprofil vermerkt. <sup>\*1</sup> Als Kontrolle diente die cDNA der Inzuchtlinien.

## 4 Diskussion

Bereits Charles Darwin stellte in seinem Buch „Die Effekte von Kreuzung und Selbstbefruchtung im Pflanzenreich“ fest, dass Inzucht generell nachteilig ist und Kreuzung im Gegensatz dazu einen Vorteil bietet (Crow, 1998). 1908 erkannte Shull die mit dem Phänomen Heterosis verbundene überdurchschnittliche Hybridvitalität, die beinahe ausnahmslos Einfluss auf die gesamte Pflanze nimmt (East, 1936). Nachkommen von Inzuchtlinien zeigen im Vergleich zu beiden elterlichen Genotypen eine erhöhte landwirtschaftliche Leistung (Swanson-Wagner *et al.*, 2006). Heterosis ist daher für die Agrarwirtschaft ein bedeutendes Phänomen, das typischerweise an ausgewachsenen, differenzierten Pflanzen, die für die Getreidezüchtung von Interesse sind, untersucht wird (Shull, 1952). Ausgewachsene Hybridpflanzen zeigen ein hohes Ausmaß an Heterosis, das gewöhnlich durch Messungen der Pflanzengröße, der Fruchtbarkeit, der Entwicklungsrate, der Widerstandsfähigkeit sowie der Anpassungsfähigkeit an verschiedene Klimate ermittelt wird (Hoecker *et al.*, 2005). Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass die erhöhte Hybridvitalität bereits während der Embryo- und frühen Keimlingsentwicklung manifestiert wird (Shull, 1952). In verschiedenen Studien war eine erhöhte Vitalität durch Untersuchungen des Trocken- und Frischgewichtes von Körnern und Embryonen (Ashby, 1930; 1932; Sprague, 1936), der Breite, der Länge und des Volumens des gesamten Embryos oder eines Embryobereiches wie der Embryoachse sowie des Endosperms (Murdoch, 1940; Kempton und McLane, 1942; Wang, 1947) in Mais messbar. Diese Untersuchungen wurden vor mehr als 60 Jahren durchgeführt und beziehen sich fast ausnahmslos auf spätere Stadien der Embryonalentwicklung. Einzig die Studie von Wang (1947), in der die Größe von acht *dap* Inzucht- und Hybridembryonen verglichen wurde, betrifft die frühe Entwicklung von *Zea mays*. Morphologische Charakterisierungen und Untersuchungen zur unterschiedlichen Genexpression in modernen F1-Hybriden und elterlichen Inzuchtlinien fokussieren heutzutage fast ausschließlich auf Entwicklungsabschnitte nach der Keimung. Über die Manifestierung und Ausprägung von Heterosis in der frühen Embryonalentwicklung von modernen Maishybriden ist bislang nichts bekannt. Molekulare Prozesse kurz nach der Befruchtung könnten jedoch von besonderer Wichtigkeit in Hinblick auf Heterosis sein, da das allelische Zusammenspiel nach der Vereinigung der beiden elterlichen Genome abgestimmt werden muss. Es könnte durchaus möglich sein, dass diese Prozesse die Basis für die spätere Leistungsfähigkeit des Sporophyten mitbestimmen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher überprüft, ob Hybridvitalität bereits in sechs *dap* Embryo- und Endospermgewebe moderner Maishybride messbar ist und erste Analysen zur Heterosis assoziierten Genexpression in diesem sehr frühen Stadium der Entwicklung vorgestellt.

#### 4.1 Phänotypisch nachweisbare Manifestierung von Heterosis in der frühen Entwicklung

Obwohl East bereits 1936 feststellte, dass die Größenzunahme bei Embryo- und Endospermgewebe nach der Kreuzung von Inzuchtlinien ein Phänomen von Heterosis ist, sind für Endosperm keine und für Embryo nur wenige phänotypische Untersuchungen vorhanden, die heterotische Merkmale in der Embryogenese belegen. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass heterotische Merkmale schon kurz nach der Kreuzung von modernen Maisinzuchtlinien etabliert werden. Bereits in sechs *dap* Embryonen und Endospermgewebe ist Heterosis über das Merkmal „Größe“ in verschiedenen Genotypkombinationen detektierbar. Wang (1947) konnte Heterosis in acht *dap* Embryonen durch die Analyse reziproker Hybride und elterlichen Inzuchtlinien nachweisen. In seinen Experimenten analysierte Wang (1947) Embryonen der beiden Genotypkombinationen 38-11/WF9 und 38-11/K64 und konnte MPH-Werte für das Merkmal „Embryolänge“ von 131% bzw. 128% für die Hybride, die auf die mütterliche Inzuchtlinie 38-11 zurückgingen, ermitteln. Das reziproke Hybrid erreichte nicht den elterlichen Durchschnitt und der BPH-Wert war mit 105% für beide Genotypkombinationen gering.

In der vorliegenden Arbeit wurden durchschnittliche MPH-Werte in Bezug auf das gleiche Merkmal von 137% bzw. 150% für die Hybride, die auf die mütterlichen Inzuchtlinien UH250 und UH301 in den interpool Kreuzungen zurückgingen, nachgewiesen. Für das Hybrid 005x301 konnte ein durchschnittlicher MPH-Wert von 107%, für die intrapool Hybriden 250x301 und 301x250 ein mittlere MPH-Wert von 112% bzw. 111% festgestellt werden. Für alle drei Genotypkombinationen wurden BPH-Werte zwischen 107% und 114% ermittelt. Vor allem die MPH-Werte, aber auch die BPH-Werte waren eindeutig höher für die im Rahmen dieser Arbeit genutzte Genotypkombinationen. Diese höheren Werte können durch die Verwendung von besser abgestimmten Inzuchtlinien bedingt sein und die großen Leistungsverbesserungen der Hybriden durch intensive Züchtungsarbeit der letzten Jahrzehnte widerspiegeln. Die Höhe der MPH- und BPH-Werte erscheint noch dramatischer, wenn man in Betracht zieht, dass anstelle von acht bereits sechs Tage ausreichend waren, um einen solchen Heterosiseffekt in modernen Maishybriden zu manifestieren. Die morphologischen Daten belegten, dass Hybridembryonen, die durch modere Maisinzuchtlinien erzeugt wurden, schon zu Beginn des Transitionsstadiums, zeitlich weit vor der Differenzierung der Embryoachse, Heterosis zeigen. Zu unterstreichen ist dabei, dass Heterosis unabhängig vom Isolierungszeitpunkt der Embryonen detektiert werden konnte und in dem Ausmaß im wesentlichen unverändert blieb. Es handelt sich folglich bei der gemessenen Hybridvitalität im Embryo um einen stabilen Effekt.

In sechs *dap* Endospermgewebe konnte Heterosis ebenfalls auf der Basis von Größenmessungen nachgewiesen werden. Der Größenzuwachs war im Vergleich zur mütterlichen Inzuchtlinie jedoch im Durchschnitt geringer als im Embryo. Die Endospermgewebe der Hybride 250x005 und 005x301 zeigten im Vergleich zur mütterlichen Inzuchtlinie im Mittel keinen Größenzuwachs. Insbesondere bei der interpool Genotyp-

kombination UH301/UH005 wurden an mehreren Isolationstagen Hybridgrößen festgestellt, die zu der mütterlichen Inzuchtlinie gleich oder nahezu gleich waren.

Die Beobachtung, dass die Größe und das Aussehen des Endosperms korrespondierend zum maternalen Genotyp ist, verweist darauf, dass viele Prozesse der Endospermentwicklung mütterlich reguliert sind (Lauria *et al.*, 2004). Die Einflussnahme durch das paternale Genom scheint in diesem triploiden Gewebe, das ein maternales zu paternales Genomverhältnis von 2:1 aufweist und über das genomische Imprinting stark mütterlich geprägt ist, folglich begrenzter als im diploiden Embryogewebe. Guo *et al.* (2003) sind der Ansicht, dass viele der im Endosperm exprimierten Gene unter der Kontrolle eines so genannten „parent-of-origin“ Effektes stehen. Der „parent-of-origin“ Effekt verweist auf verschiedene Mechanismen, die die Genexpression in Abhängigkeit zum elterlichen Ursprung regulieren. Diese Mechanismen umfassen maternale Effekte, die von Mitochondrien- und Chloroplastengenomen ausgehen, und andere cytoplasmatische Faktoren, Gendosiseffekte sowie genomisches Imprinting, bei dem die Expression des Allels von der Vererbung durch den Vater bzw. der Mutter abhängig ist (Guo *et al.*, 2003). Ferner stellten Guo *et al.* (2003) bei der Untersuchung von 10, 14 und 21 dap Endospermgewebe eine größtenteils dosisabhängige Genexpression fest, die das elterliche Genomverhältnis von 2:1 abbildete.

Die maternalen Einflüsse auf das Endosperm scheinen unter verschiedenen Gegebenheiten jedoch unterschiedlich stark zu sein, da im Rahmen dieser Arbeit auch bei der Genotypkombination UH301/UH005, bei der diese Einflüsse am stärksten zu Tage traten, an verschiedenen Isolationstagen Größenzuwächse des Hybridendosperms im Vergleich zu dem Endosperm der mütterlichen Inzuchtlinie von bis zu 128% gemessen wurden.

Aufgrund der starken maternalen Einflüsse, die auf die Entwicklung des Endosperms einwirken, unterschieden sich die Endospermgewebe der reziproken Hybride deutlich. Auch bei der im Rahmen dieser Arbeit vorgestellten phänotypischen Analyse von Embryonen war eine Präferenz der Hybridgewebe zu mütterlichen Merkmalen hinsichtlich der Embryolänge und Zellfläche erkennbar. Bereits Ashby, der 1930 zum ersten Mal reziproke Hybriden verglich, fand heraus, dass diese z.B. im Embryogewicht stark variierten und dadurch ein unterschiedliches Maß an Heterosis zeigten. Ähnlich wie in den vorgestellten phänotypischen Untersuchungen (Kapitel 3.1) variierte in den Analysen von Wang (1947) der MPH-Wert der reziproken Hybriden in sofern, als dass der Zuwachs in der Hybridgröße sich auf der mütterlichen Größe der Inzuchtembryonen aufbaute und die Inzuchtlinien deutlich unterschiedliche Embryogrößen aufwiesen. Diese Ergebnisse spiegeln die starke maternale Einflussnahme in diesem frühen Entwicklungsstadium wieder, welche durch eine Kombination von Effekten sporophytischen und gametophytischen Ursprungs erklärt werden könnte (Chaudhury und Berger, 2001) und möglicherweise auch durch die Interaktion mit dem triploidem Endosperm, welches zwei Kopien des maternalen Genoms aufweist und stark maternal geprägt ist, ausgelöst wird (Costa *et al.*, 2004).

Auch Hoecker *et al.* (2005) wiesen in jungen Maiskeimlingen bei einigen heterotischen Merkmalen (z.B. Länge der Primärwurzel) beträchtliche reziproke Effekte nach. Gemäß Kolipara *et al.* (2002) können Unterschiede dieser Art in diploidem Gewebe epigenetischen Phänomenen, wie zum Beispiel genomischem Imprinting oder cytoplasmatischen Effekten,

zugeordnet werden. Genomisches Imprinting verweist auf reversible epigenetische Modifikationen bestimmter Genorte, was zu einer differentiellen Expression der Gene in Abhängigkeit des elterlichen Ursprungs führt (Kolipara *et al.*, 2002). Hoecker *et al.* 2005 schlussfolgerten daher, dass möglicherweise epigenetische Effekte eine bedeutende Rolle während der frühen Entwicklung der Primärwurzel in Mais spielen. Möglicherweise könnte dies auch für die Embryonalentwicklung zutreffen. Zu bedenken ist jedoch, dass genomisches Imprinting bislang ausschließlich für Endospermgewebe gezeigt werden konnte und bisher nur wenige Gene in Pflanzen gefunden wurden, die ein genomisches Imprinting aufwiesen (Guo *et al.*, 2003).

Durch experimentelle Untersuchungen von Hybriden aus 37 Gattungen, zusätzlich zu den Untersuchungen von zahlreichen natürlichen Hybriden konnte East (1936) belegen, dass sich Heterosis mit der genetischen Verschiedenheit zwischen den Eltern erhöht. Für Mais stellte Guo *et al.*, (2006) fest, dass Hybride je nach Verwandtschaftsgrad der elterlichen Inzuchtlinien ein unterschiedliches Maß an Heterosis aufweisen.

Dieser Zusammenhang zwischen Verwandtschaftsgrad und Heterosisausprägung ist bereits in sechs *dap* Hybridembryonen feststellbar. Die Genotypkombinationen der interpool Kreuzungen zeichnen sich durch größere genetische Distanz zwischen den Inzuchtlinien aus und zeigten bezüglich der BPH- und MPH-Werte die stärkste Heterosis. Im Gegensatz dazu war die auf der Basis der BPH- und MPH-Werte nachgewiesene Heterosis in der intrapool Kreuzung deutlich geringer. Auch fiel der durchschnittliche Größenzuwachs im Vergleich zur mütterlichen Inzuchtlinie bei dieser Genotypkombination, die durch eine kleinere genetische Distanz zwischen den Inzuchtlinie gekennzeichnet ist, eindeutig geringer aus.

In Hinblick auf sechs *dap* Endospermgewebe der F1-Hybride ist der erwartete Zusammenhang zwischen Verwandtschaftsgrad und Heterosisausprägung nicht feststellbar oder umgekehrt. Bei den phänotypischen Untersuchungen der Endospermgewebe konnte für die intrapool Genotypkombination die stärkste Heterosis nachgewiesen werden.

Wang (1947) leitete von den Untersuchungen der acht *dap* Hybrid- und Inzuchtembryonen in Mais ab, dass die Hybride aufgrund einer erhöhten Wachstumsrate größer waren als die maternalen Inzuchtlinien. Bei der pazifischen Auster (*Crassostrea gigas*) wurde Heterosis zum einen auf der Basis von Größemessungen im Larvenstadium und zum anderen auf der Grundlage einer erhöhten Wachstumsrate der Hybride im Vergleich zu den Inzuchtlinien zwischen dem zweiten und fünften Tag der Entwicklung festgestellt (Hedgecock *et al.*, 2006). East (1936) war der Ansicht, dass der Hybridvorteil in Pflanzen hauptsächlich durch erhöhte Proliferation der Zellen in einigen aber nicht allen Geweben erreicht wird. Er schlussfolgerte dies aus dem Vergleich von Hybridpappel mit den elterlichen Pflanzen. Die Veränderungen zwischen Hybriden und elterlichen Linien wären denen ähnlich, die auch bei Wachstum unter guten und schlechten Bedingungen auftreten würden, was dafür sprechen würde, dass die Zellteilung merklich stärker beeinflusst ist als die Zellgröße (East, 1936). Auch frühe morphologische Untersuchungen führten 90% der Heterosis für Pflanzenhöhe auf eine erhöhte Zellzahl zurück, nur 10% konnten einer erweiterten Zellgröße zu geschrieben werden (Kieselbach, 1922).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte auf der Basis von mikroskopischen und histologischen Techniken gezeigt werden, dass in sechs *dap* F1-Hybridembryonen die signifikante Größenzunahme gegenüber der mütterlichen Inzuchtlinie durch eine schnellere Entwicklung basierend auf erhöhten Zellteilungsraten ausgelöst wird. Indizien dafür, dass eine durch Heterosis ausgelöste Expansion der Zellgröße der Grund für den Längenzuwachs der Hybriden war, wie es für Keimlingswurzeln von Maishybriden beschrieben wurde (Hoecker *et al.*, 2005), konnten nicht gefunden werden. Im Gegensatz zu den eingangs geschilderten Quellen bedienten sich Hoecker *et al.* (2005) auch modernen mikroskopischen und histologischen Methoden, um die Ursache für die mit dem Primärwurzelnwachstum assoziierte Heterosis zu bestimmen. Über die Vermessung der kortikalen Zellen konnte jedoch von Hoecker *et al.* (2005) nachgewiesen werden, dass das Merkmal der verlängerten Primärwurzel in Hybriden assoziiert ist mit einer signifikant erhöhten Zellstreckung der kortikalen Zellen.

Die in der vorliegenden Arbeit bei sechs *dap* Hybriden festgestellte erhöhte Anzahl an Zellteilungen im selben Entwicklungszeitraum ist Kennzeichen einer schnelleren Entwicklung. Diese schnellere Entwicklung war anhand der phänotypische Analysen von acht *dap* Embryonen, die aus der interpool Kreuzung der modernen Inzuchtlinien UH301 und UH005 hervorgingen, nachvollziehbar. Arbeiten von Shafer (1944) und Buchholz (1945) belegen eine schnellere Entwicklung nach der Ausprägung der Embryoachse in Mais oder der Bildung der Meristeme in Embryonen der Kiefer.

Die im Rahmen dieser Arbeit beschriebenen phänotypischen Untersuchungen wiesen heterotischen Merkmale bereits in sechs *dap* Embryonen und Endospermgewebe nach. Die Existenz dieser heterotischen Merkmale zeugt von dem Einfluss beider elterlichen Genome schon während der frühen Embryogenese, da die Ausprägung von Heterosis auf der Aktivität unterschiedlicher Genome beruht. Der Nachweis von Heterosis ist die Grundvoraussetzung für die molekulare Analyse der Genexpression in diesem frühen Entwicklungsstadium von Embryo- und Endospermgewebe gewesen. Der signifikante Größenzuwachs der Hybridembryonen im Vergleich zur mütterlichen Inzuchtlinie gab Anlass zu detaillierten allelspezifischen Expressionsanalysen, mit deren Hilfe festgestellt werden sollte, ob Heterosis assoziierte Expressionsmuster schon früh in der Entwicklung initialisiert werden könnten.

## 4.2 Heterosis assoziierte Genexpression in der frühen Entwicklung

Die Pionierarbeit von Shull (1908) und East (1908) machten Mais zu der Modellpflanze für Heterosis. Die Arbeiten von McClintock legten den Grundstein für die genetische und molekularbiologische Forschung an Mais. In der Maiszüchtung wird Heterosis seit vielen Jahrzehnten stark ausgenutzt und doch ist die Kenntnis über genetische und molekulare Mechanismen, die dem Phänomen zu Grunde liegen, immer noch sehr begrenzt (Guo *et al.*, 2006). Heutzutage kann an die molekularen und genetischen Kenntnisse, die in verschiedenen Forschungsgebieten gewonnen wurden, angeknüpft werden, um Heterosis insbesondere in Mais molekular zu hinterfragen, wodurch neuen Züchtungsstrategien der Weg geebnet werden kann.

Obwohl alle Gene der F1-Hybride durch die elterlichen Inzuchtlinien gegeben werden, ist die Hybridleistung deutlich unterschiedlich von der ihrer Eltern (Yao *et al.*, 2005). Daher kann gemäß Yao *et al.* (2005) durchaus begründet darüber spekuliert werden, dass eine unterschiedliche Genexpression zwischen Hybriden und Elternlinien (Ni *et al.*, 2000; Wu *et al.*, 2003; Sun *et al.*, 2004) für die beobachtete Heterosis verantwortlich ist. Um eine Erklärung für die molekulare Basis von Heterosis zu finden, ist es wichtig, die Genexpression im Hybrid- und Inzuchtstatus zu verstehen (Auger *et al.*, 2005). Umfangreiche Untersuchungen könnten Informationen über das Spektrum der Gene geben, die eine veränderte Expression in Hybriden zeigen, und die Richtung der Veränderung aufzeigen, so dass ein molekulares Modell für Heterosis formuliert werden kann (Yao *et al.*, 2005).

Ein wesentliches Problem bei der Untersuchung von Heterosis an ausgewachsenen Pflanzen ist, dass Heterosis zu diesem Entwicklungszeitpunkt bereits manifestiert ist. Folglich ist es möglich, dass detektierte Genexpressionsunterschiede, die zwischen ausgewachsenen Inzucht- und Hybridpflanzen nachgewiesen werden, nicht die Unterschiede in Heterosis assoziierter Genexpression widerspiegeln, sondern sekundäre Effekte aufzeigen (Hoecker *et al.*, 2005).

Da es denkbar ist, dass die Erzeugung einer besonderen Hybridvitalität von dem koordinierten Zusammenspiel der elterlichen Allele nach der Vereinigung der zwei Genome und der Etablierung bestimmter Expressionsmuster abhängt, kann die Untersuchung der molekularen Prozesse in der frühen Embryonalentwicklung einen wichtigen Beitrag zur Aufklärung Heterosis assoziierter Mechanismen leisten.

### 4.2.1 Techniken zur Analyse der Heterosis assoziierten Genexpression in der frühen Embryogenese

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedenste Techniken eingesetzt, die erst in der Kombination die Untersuchung der Heterosis assoziierten Genexpression in den frühen Stadien der Entwicklung von *Zea mays* ermöglichten.

Grundlegend für den Erfolg der molekularen Analysen war die Mikrodissektionstechnik. Sie erlaubt die gezielte Isolation von Geweben und ermöglicht dadurch kontrollierte Untersuchungen der frühen Embryogenese (Kranz und Dresselhaus, 1996; Le *et al.*, 2005).

Da diese Technik die mikroskopische Kontrolle der isolierten Gewebe mit einschließt (Kranz und Kumlehn, 1999), waren ungewollte Einflüsse durch maternales Gewebe oder andere Geweben des Maiskorns, die sich auf die Aussagekraft der Expressionsuntersuchungen negativ auswirken hätten, in den molekularen Analysen ausgeschlossen.

Zur Identifikation von differentiell exprimierten Genen zwischen Hybrid- und Inzuchtembryonen wurde ein kombinierter Ansatz aus SSH und Microarrayhybridisierungen genutzt, wobei zunächst ein differentielles Screening mit den subtrahierten cDNA-Banken und -Populationen durchgeführt wurde.

SSH ist eine hoch effiziente PCR basierte cDNA-Subtraktionsmethode, die dazu genutzt werden kann, stärker oder ausschließlich exprimierte cDNAs anzureichern (Diatchenko *et al.*, 1999; 1996). Diese Methode beruht auf einer suppressiven PCR und verbindet in einer Prozedur Normalisierung und Subtraktion. Der Normalisierungsschritt gleicht die Häufigkeiten verschiedener cDNAs innerhalb der untersuchten Probe an (Diatchenko *et al.*, 1999; 1996). Durch eine Runde der subtraktiven Hybridisierung können deshalb seltene Sequenzen über 1000fach angereichert werden, wodurch die Möglichkeit, auch differentiell exprimierte cDNAs mit niedrigem Transkriptniveau zu untersuchen, drastisch erhöht wird (Diatchenko *et al.*, 1999; 1996). Gemäß Le *et al.* (2005) konnte die Zweckmäßigkeit der SSH-Methode als Instrument zur Herstellung eines vollständigen Transkriptprofils, besonders zur Identifikation von neuen und schwach exprimierten Genen, kürzlich durch eine vergleichende Studie von SSH und Affimetrix-GeneChip-Microarrays mit humanen Zellen demonstriert werden (Cao *et al.*, 2004). SSH hat sich auch bei der Identifikation von differentiell exprimierten Genen in Pflanzen als effektiv erwiesen (Le *et al.*, 2005). Beispiele dafür sind die Untersuchung von transkriptionalen Veränderungen als Antwort auf Stress (Zheng *et al.*, 2004), Analysen der Primärwurzelspitze (Bassani *et al.*, 2004) und Untersuchungen von Pflanzen, die den Transkriptionsfaktor Dof überexprimieren (Kang *et al.*, 2003).

Die Microarraytechnik gestattet, die Expression tausender Gene gleichzeitig leicht und Kosten effektiv zu untersuchen (Welford *et al.*, 1998; Kerr *et al.*, 2000), wodurch Rückschlüsse auf globale Genexpressionsmuster möglich sind. Im Rahmen vieler Arbeiten (Vuylsteke *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 2006; Stupar und Springer, 2006; Swanson-Wagner *et al.*, 2006) ist diese Methode daher bereits verstärkt eingesetzt worden. Ozturk *et al.* zeigten schon 2002, dass bei Verwendung von entsprechenden, nicht weiter charakterisierten cDNAs als Microarraysonden Veränderungen in Transkripthäufigkeiten detektiert werden können, deren Profile präzise die zu untersuchenden Wachstumsbedingungen der Pflanzen abbilden. Die Kombination von SSH und cDNA Microarrayanalysen ergibt eine schnelle und zuverlässige Methode, mit deren Hilfe sicher differentiell exprimierte Gene aufzufinden sind (Gardmo *et al.*, 2002; Rho *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 1999).

Die Analysen von Le *et al.* (2005) konnten zeigen, dass der kombinierte Ansatz aus SSH und differentiellem Screening auch bei limitiertem Probenmaterial hoch effizient ist und sogar die Identifikation von schwach exprimierten Genen, die eine differentielle Expression in dem untersuchten limitierten Probenmaterial aufweisen, ermöglicht.

Microarray basierte Analysen sind nützlich als ein Überprüfungsinstrument beim Vergleich der Genexpression in Inzuchtlinien und Hybriden, um das Ausmaß der quantitativen

Veränderung und die Art des Expressionsverhaltens im Hybrid zu bestimmen (Stupar und Springer, 2006). Da es sogar bei Arrays mit tausenden von Genen möglich ist, dass differentiell exprimierte Schlüsselgene fehlen, weil nur ein Teil der potentiell exprimierten Gene in einem Array zusammengefasst sind (Welford *et al.*, 1998), wurde im Rahmen dieser Arbeit ein thematisch fokussiertes Array entworfen, in dem fast ausschließlich cDNAs und Gene zusammengestellt sind, die in der frühen Entwicklung exprimiert werden oder für die Embryogenese entscheidend sein könnten. Die Strategie, nur cDNAs des betreffenden Gewebes bzw. Entwicklungsstadiums oder ein Set von Genen besonderen Interesses zu untersuchen, führte bereits bei anderen Forschungsarbeiten (Welford *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 1999; Voiblet *et al.*, 2001; Lippman *et al.*, 2004; Le *et al.*, 2005) zum Erfolg.

Da es möglich und sogar wahrscheinlich ist, dass die Heterosis relevanten Mechanismen nur leichte Veränderungen in der Genexpression hervorrufen, die unterhalb des zweifachen Expressionsniveaus liegen (Birchler *et al.*, 2003), wurde im Rahmen dieser Arbeit von der AG Piepho die Entwicklung eines angepassten gemischtes Modells (Keller *et al.*, 2005) vorgenommen, um auch Veränderungen geringerem Ausmaß sicher detektieren zu können.

Da Kreuzhybridisierungen von nahe verwandten Mitgliedern einer Genfamilie bei Microarrayhybridisierungen nicht ausgeschlossen werden können (Schenk *et al.*, 2003), sind nachfolgend Analysen zur Überprüfung der Microarrayergebnisse erforderlich. qRT-PCR ist eine der zuverlässigsten und sensitivsten Techniken, die für die Validierung genutzt werden kann (Ginzing, 2002), weil sie die direkte Messung der Transkriptmengen ermöglicht (Schmittgen und Zakrajsek, 2000). Da die Auflösungskraft für die Unterscheidung von tatsächlich additiven Expressionsmustern und schwach nicht additiven Expressionsmustern bei Microarray basierten Ansätzen begrenzt ist (Stupar und Springer, 2006), wurde qRT-PCR in der vorliegenden Arbeit nicht nur zur Validierung der Ergebnisse, sondern auch zur Erfassung von Expressionsmustern genutzt.

In den qRT-PCR Versuchen, aber auch in allen anderen molekularen Analysen, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, wurde amplifizierte cDNA eingesetzt, die den Vorgaben von Le *et al.* (2005) entsprechend hergestellt wurde. Endege *et al.* (1999) wiesen nach, dass amplifizierte cDNA, die mit Hilfe der SMART cDNA-Synthesemethode erzeugt worden ist, weiterhin stark, moderat und schwach exprimierte Transkripte repräsentativ abbildet und dadurch für Genexpressionsanalysen geeignet ist. Al-Taher *et al.* (2000) demonstrierten, dass bei Einsatz von amplifizierten cDNAs die akkurate Messung von einem spezifischen cDNA-Molekül in  $10^8$  cDNA-Molekülen möglich ist.

Für die allelspezifischen Expressionsanalysen wurde in der vorliegenden Arbeit, wie auch bei Stupar und Springer (2006), die Sequenomtechnik genutzt. Es handelt sich hierbei um eine SNP-Genotypisierungsmethode, die auf MALDI-TOF Technik basiert und gut reproduzierbare Analysen ermöglicht (Ding, 2006).

#### 4.2.2 Heterosis assoziierte Genexpression in den untersuchten Genotypkombinationen

Expressionsanalysen von Entwicklungsstadien nach der Keimung zeigten auf, dass große Expressionsunterschiede die unterschiedlichen phänotypischen Charakteristika der Hybride und elterlichen Inzuchtlinien begleiten (Bao *et al.*, 2005; Guo *et al.*, 2006; Swanson-Wagner *et al.*, 2006). Im Rahmen dieser Arbeit konnten heterotische Merkmale bereits in sechs dap Embryo- und Endospermgewebe nachgewiesen werden. Um erste Einblicke in die Genexpression der phänotypisch untersuchten Hybrid- und Inzuchtgewebe kurz nach der Befruchtung zu erhalten, wurden Expressionsanalysen auf der Basis eines differentiellen Screenings und eines thematisch fokussierten Mikroarrays durchgeführt.

Sowohl im differentiellen Screening mit angereicherten Sonden (Kapitel 3.4) als auch bei den Expressionsuntersuchungen mit dem thematisch fokussierten Heterosis-3k-Array (Kapitel 3.5), bei denen die cDNA-Populationen der zu untersuchenden Gewebe ohne vorherige Anreicherung eingesetzt wurden, konnten zwischen Hybrid- und Inzuchtgeweben differentiell exprimierte Gene nachgewiesen werden. Die Analysen mit dem Heterosis-3k-Array zeigten, dass innerhalb aller cDNA-Banken, die Hauptbestandteil des produzierten Arrays waren, differentiell exprimierte cDNAs detektiert werden konnten (Kapitel 3.5.2). Dies beweist, dass sowohl von Transkripten, die vor der Befruchtung exprimiert werden, als auch von Chromatingenen, ein prägender, Heterosis assoziierter Einfluss auf sechs dap Embryonen und Endospermgewebe ausgehen kann. Die Vermutung von Yao *et al.* (2005), dass Gene, die die epigenetische Kontrolle z.B. durch DNA-Methylierung, Histonmodifikation oder Chromatinremodulierung ausüben, mit der transkriptionalen Veränderung zwischen Hybriden und Inzuchtlinien in Beziehung stehen könnten, kann daher mit Nachdruck vertreten werden.

Die Sequenzanalysen der differentiell exprimierten Gene in sechs dap Embryogewebe der interpool Genotypkombination UH301/UH005 (Kapitel 3.6.1) legten ferner nahe, dass die differentiell exprimierten Gene der Eizell- und Zentralzellbank genauso wie die identifizierten Gene der subtrahierten Embryo- und Endospermbank auf Grund der Homologie in unterschiedlichste funktionelle Klassen eingestuft werden können, wobei die Einordnung in die Kategorien „Metabolismus und Energie“ sowie „Transkription“ häufig vorgenommen wurde.

Das differentielle Screening zielte auf die Identifikation von Genen, die im Hybridembryo 301x005, der im Vergleich zu beiden elterlichen Inzuchtlinien einen deutlichen Größenzuwachs zeigte, höher exprimiert sind (Kapitel 3.4).

Durch die Analysen konnte festgestellt werden, dass 8,7% und 15,3% der untersuchten, subtrahierten cDNAs ein mehr als zweifach höheres Expressionsniveau im Hybrid im Vergleich zu den Inzuchtlinien aufwiesen. Da nachgewiesen werden konnte, dass die Subtraktionsreaktion effizient war, weist dieser relativ geringe Anteil an cDNAs mit einer höheren differentiellen Expression in einer angereicherten Population darauf hin, dass generell wenig Gene hohe Unterschiede in den Expressionsniveaus zwischen Hybrid- und Inzuchtembryonen zeigen. Dies steht in Einklang mit den Ergebnissen von Swanson-Wagner *et al.* (2006). In den von Swanson-Wagner *et al.* (2006) durchgeführten Microarrayanalysen waren 9,8% der 13999 untersuchten Genen in Maiskeimlingen differentiell zwischen dem

Hybrid und den elterlichen Inzuchtlinien exprimiert, wobei der Hauptanteil der Genen einen weitaus geringeren Expressionsunterschied als zweifach zeigte.

Ähnlich dazu waren die Ergebnisse der Untersuchungen von Bao *et al.* (2005). Hier konnte ein Anteil von ungefähr 4% der untersuchten Gene mit Hilfe der Methode „serial analysis of gene expression“ (SAGE) zwischen einem Reishybrid und den elterlichen Kultivaren in den Rispen, Blättern und Wurzeln als differentiell exprimiert identifiziert werden. Auch Huang *et al.* (2006) detektierten zwischen einem Hybrid und den elterlichen Inzuchtlinien bei der Untersuchung von 9198 cDNAs, die ausschließlich aus dem zu untersuchenden Rispengewebe von Reis stammten, nur 4,8% differentiell exprimierte Klone. Ebenso zeigten die Untersuchungen mit dem Heterosis-3k-Array (Kapitel 3.5), dass insgesamt nur 7,3% und 5,4% der untersuchten cDNAs und Genfragmente zwischen den Genotypen der interpool bzw. intrapool Kreuzung eine differentielle Expression in Embryogewebe aufwiesen.

Für triploides Endospermgewebe wurden allerdings im Gegensatz zum diploiden Embryogewebe eindeutig mehr differentiell exprimierte cDNAs und Genfragmenten bei den Untersuchungen mit dem Heterosis-3k-Array nachgewiesen. Insgesamt 29,0% und 12,7% der Genfragmente konnten durch den Vergleich der Genotypen der interpool bzw. intrapool Kreuzung als differentiell exprimiert detektiert werden. Diese erhöhte Detektionsrate kann durch die unterschiedlichen Ploidiegrade der Gewebe (Embryo diploid, Endosperm triploid) begründet sein.

Gemäß Chaudhury *et al.* (2001) ist für die Erforschung der Samenentwicklung das Verstehen der Genaktivität in Geweben verschiedener Ploidiegrade von zentraler Bedeutung. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Übereinstimmungen zwischen den zwei untersuchten Geweben des Korns, Embryo und Endosperm, in Hinblick auf die differentiell exprimierten Gene sowohl in der interpool als auch intrapool Genotypkombination feststellbar waren (Kapitel 3.5.2, Abb. 17). Da schon lange bekannt ist, dass die genetische und physiologische Balance zwischen Endosperm, Embryo sowie maternalem Gewebe für eine korrekte Samenentwicklung wichtig ist (Chaudhury *et al.*, 2001), könnten sich möglicherweise unter diesen Genen solche befinden, die für die Ausprägung von Heterosis in der frühen Entwicklung *per se* notwendig sind.

Da es ferner auch möglich sein kann, dass bestimmte Gene speziell eine Heterosis assoziierten Expression in einem der beiden analysierten Gewebe aufweisen, wurde die Genexpression in reziproken Hybriden und den elterlichen Inzuchtlinien in zwei verschiedenen Genotypkombinationen untersucht. Der Vergleich der differentiell exprimierten cDNAs der verschiedenen Genotypkombinationen zeigte, dass gleiche cDNAs im Embryogewebe bzw. im Endospermgewebe beider Genotypkombinationen nachweisbar waren (Kapitel 3.5.2, Abb. 17). Es ist denkbar, dass insbesondere zu diesen cDNAs solche zählen, die mit der Ausprägung von Heterosis in dem jeweiligen Gewebe in Zusammenhang stehen.

### 4.2.3 Nachweis der dosisabhängigen Expression sowie des paternalen Einflusses im Endosperm

Der Vergleich der differentiellen Genexpression in diploidem Embryo- und triploidem Endospermgewebe zeigte, dass deutliche Unterschiede zwischen den untersuchten Geweben in Hinblick auf die Genexpression bestehen (Kapitel 3.5.2). Es konnten zum einen insgesamt eindeutig mehr differentiell exprimierte Gene im Endosperm- als im Embryogewebe identifiziert werden (Tab. 7), zum anderen unterschied sich das Expressionsverhalten einer Vielzahl von Genen zwischen den beiden Geweben in erkennbarer Weise (Abb. 18). Auch Stupar und Springer (2006) stellten bei der Untersuchung von unbefruchteten Kolben, 19 dap Embryonen und 11 Tage alten Keimlingen fest, dass zwar in den verschiedenen Geweben die Expression der zu überprüfenden Gene zu detektieren war, aber das Expressionsniveau signifikant zwischen den Geweben variierte.

Ähnlich wie Stupar und Springer (2006), die zwischen den Maisinzuchtlinien MO17 und B73 zahlreiche Gene als differentiell exprimiert detektierten, konnte sowohl im Embryo- als auch im Endospermgewebe eine unterschiedliche Expression zwischen den Inzuchtlinien UH301 und UH005 nachgewiesen werden, wobei die Anzahl der differentiell exprimierten Gene im Endospermgewebe um das mehr als vierfache höher war (Tab. 7). Dieser festgestellte Unterschied zwischen Embryo- und Endospermgewebe läßt vermuten, dass sich die Inzuchtlinien UH301 und UH005 nicht vornehmlich in der Zusammensetzung der Gene unterscheiden, sondern vielmehr in der Regulation der einzelnen Gene. Stupar und Springer (2006) konnten in ihren Untersuchungen feststellen, dass die meisten Gene, die ausschließlich von einer Inzuchtlinie exprimiert wurden, im Genom beider Inzuchtlinien vorlagen, aber auf Grund von Unterschieden in der transkriptionalen Regulation nicht gleich stark exprimiert wurden.

Quantitative Veränderungen sind mit *cis* und *trans* Unterschieden in der Genregulation verbunden (Wittkopp *et al.*, 2004), die auf Veränderungen der DNA-Sequenz durch Mutationen beruhen. Die Genome von verschiedenen Maisinzuchtlinien weisen einen hohen Grad an Sequenzunterschieden auf (Tenailon *et al.*, 2001; Vroh Bi *et al.*, 2005), die sowohl in Nukleotid- als auch Insertions- bzw. Deletionspolymorphismen begründet sind. Das gleiche Genomintervall von verschiedenen Inzuchtlinien kann sich daher wesentlich in Größe und Zusammensetzung unterscheiden (Song und Messing, 2003).

320 der insgesamt 549 zwischen den Inzuchtlinien UH301 und UH005 im Endosperm differentiell exprimierten Gene zeigten eine erhöhte, möglicherweise auch ausschließliche Expression in der Inzuchtlinie UH301 und grenzten sich dadurch deutlich im Inzuchtvergleich von anderen Genen ab (Abb. 18-I). Durch die farbliche Kennzeichnung dieser Gene in Abbildung 18 konnte die Expression in verschiedenen Vergleichen nachvollzogen werden. Da im Endospermvergleich „301x005 vs 005x005“ in Hinblick auf die 320 gekennzeichneten Gene kein wesentlicher Unterschied zum Inzuchtvergleich festzustellen war, kann geschlussfolgert werden, dass die Kopienanzahl der betreffenden Gene im Genom für die Expression in sechs dap Endosperm entscheidend ist. Die Schlußfolgerung steht in Einklang mit der Feststellung von Birchler (1993) und Baroux *et al.* (2002), dass Dosiseffekte eine

wichtige Rolle in der Endospermentwicklung spielen. Die Ergebnisse von Guo *et al.* (2003), die darlegen, dass die Expression der meisten Gene in 10, 14, 21 ddp Endosperm dosisabhängig und somit proportional zum elterlichen Genombeitrag ist, unterstützen die Schlußfolgerung ebenso wie die im Endosperm der reziproken Hybriden 301x005 und 005x301 vorgefundene differentielle Expression vieler Gene. Das Endosperm ist ein triploides Gewebe, daher liegen im Hybridgewebe zwei Kopien des mütterlichen Allels und eine Kopie des väterlichen Allels vor. Wenn die elterlichen Allele unterschiedlich stark exprimiert werden, führt dies in triploidem Gewebe bei einer dosisabhängigen Expression zu unterschiedlichen Transkriptniveaus in den reziproken Hybriden.

Im Vergleich dazu konnte im diploiden Embryogewebe der reziproken Hybride 005x301 und 301x005 kein Genexpressionsunterschied detektiert werden. Auch Stupar und Springer (2006) konnten in den reziproken Hybriden der Kreuzung B73/Mo17 in den diploiden Geweben von 11 Tage alten Keimlingen, unreifen Kolben und 19 ddp Embryonen keine Unterschiede im Genexpressionsniveau nachweisen.

Die Daten von Guo *et al.* (2003) wiesen darauf hin, dass im Hybridendosperm das mütterlich vererbte Allel stärker exprimiert wird. Daher schlossen Guo *et al.* (2003) aus DNA-Methylierungsprofilen des Maisendospermgewebes, die zeigten, dass mütterlich vererbte Allele stärker demethyliert sind als väterlich vererbte Gene (Lauria *et al.*, 2004), dass mütterliche Allele einen aktiveren Status haben könnten als väterliche Allele. Die im Rahmen dieser Arbeit dargelegten Ergebnisse des Endospermvergleich „005x301 vs 005x005“ zeigten jedoch, dass sich die im Endosperm des Hybrid 005x301 stärker exprimierten Gene weiterhin vornehmlich aus der Gruppe der 320 in der Inzuchtlinie UH301 stärker exprimierten Gene ableiten, was bedeutet, dass das männliche Genom auch im triploiden Endosperm einen nicht zu vernachlässigen Einfluss auf die Genexpression hat.

Dieser Einfluss ist für die Ausprägung von Heterosis im Endosperm und möglicherweise auch im Embryo entscheidend. Gemäß Chaudhury *et al.* (2001) spielt das Endosperm für den Embryo auch neben der Nährstoffzulieferung (Lopes und Larkins, 1993) eine Rolle: Studien in Karotten legten eindeutig dar, dass das Endosperm eine Quelle für Signale ist, die mit der Embryogenese verbunden sind (Van Hengel *et al.*, 1998) und dass es Interaktionen zwischen Embryo und Endosperm gibt. Ähnliche Schlussfolgerungen wurden auch aus Studien mit Mais gezogen (Opsahl-Ferstad *et al.*, 1997).

Interessant ist, dass zu der Gruppe der 320 in der Inzuchtlinie UH301 stärker exprimierten Gene neben vielen unbekanntenen Genen auch Gene gehörten, die eine Homologie zu Kinasen, ribosomalen Proteinen und solchen Genen zeigten, die eine mögliche Funktion im Metabolismus wahrnehmen.

#### **4.2.4 Differentielle Expression von regulatorischen Genen ist mit Heterosis assoziiert**

Im Rahmen des differentiellen Screenings wurden 60 cDNAs, die eine differentielle Expression zwischen dem Embryogewebe des Hybrids 301x005 und einer der Inzuchtlinien UH301 oder UH005 zeigten, sequenziert (Kapitel 3.4.2). Durch die Microarrayanalysen mit dem Heterosis-3k-Array konnten des Weiteren 223 cDNAs, die im Embryogewebe zwischen

den Genotypen der interpool Kreuzung UH301/UH005 differenziell exprimierte waren, ermittelt werden (Kapitel 3.5). Für 149 dieser cDNAs, die aus nicht weiter charakterisierten cDNA-Banken stammten, lagen Sequenzdaten vor (Kapitel 3.6.1). Sowohl für das im differentiellen Screening identifizierte Set von Genen als auch für die differenziell exprimierten Gene, die mit Hilfe des Heterosis-3k-Array ermittelt werden konnten, wurden Sequenzhomologien bestimmt und eine funktionelle Klassifikation durchgeführt.

In beiden Ansätzen zur Identifikation von Heterosis assoziierten Genen konnten interessanterweise 3 bzw. 4 neue, bislang unbekannte Gene identifiziert werden. Ferner zeigten insgesamt 37 der Sequenzen signifikante Homologie zu unbekanntem oder hypothetischen Proteinen, für die bislang keine Funktion ermittelt werden konnte. Die Homologie dieser Sequenzen zu vorausgesagten Proteinen in *Arabidopsis* oder Reis als auch die Identifikation der 7 unbekanntem Gene deutet darauf hin, dass der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte methodische Ansatz in der Lage war, Transkripte von bislang nicht charakterisierten Proteinen mit einem möglichen Bezug zu Heterosis zu identifizieren.

Innerhalb des Sets der Gene, die im Rahmen des differentiellen Screening als Heterosis assoziiert nachgewiesen und funktionell klassifiziert werden konnten, waren cDNAs mit Homologie zu Proteinen, die in der Signaltransduktion involviert sind, am stärksten vertreten (Abb.14). Auch bei der Klassifikation der sequenzierten, im Embryogewebe der Genotypkombination UH301/UH005 differenziell exprimierten Gene aus nicht charakterisierten cDNA-Banken war eine Einordnung in die Kategorie „Signaltransduktion“ häufig vorgenommen worden (Abb. 22). Projekte, die die zufällige Sequenzierung von cDNA-Banken und die nachfolgende funktionelle Klassifizierung zum Ziel hatten, erzeugten Daten hinsichtlich des Anteils von bestimmten funktionellen Kategorien, der innerhalb eines Gewebes oder Zelltyps charakteristisch ist. Einige dieser Projekte sind vergleichbar mit den Ansätzen, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, da für die Klassifizierung identische Kategorien genutzt und ähnliche Gewebe untersucht wurden.

Der Anteil von klassifizierten cDNAs, die der Kategorie „Signaltransduktion“ zugeordnet wurden, war in den Ovarien der Tomate nach der Befruchtung 7,7% (Germain *et al.*, 2005), in zweizelligem Weizenembryo 2% (Sprung *et al.*, 2005) und in einem kombinierten, einzigartigen Set von verschiedenen Entwicklungsstadien der Embryogenese von Sonnenblume 3% (Ben *et al.*, 2005). Im Vergleich zu diesen Daten ist das identifizierte, differenziell exprimierte cDNA-Set des differentiellen Screenings, in dem 25% der klassifizierbaren Gene mit Signaltransduktion verbunden sind, eindeutig angereichert für Gene dieser Kategorie. Da auch in dem Set der Gene, das in Embryogewebe der Genotypkombination UH301/UH005 differenziell exprimiert war und bei Untersuchungen mit nicht subtrahierten cDNA-Populationen identifiziert wurde, bei 11,8% der Gene eine Einordnung in die Kategorie „Signaltransduktion“ erfolgte, kann auf einen Zusammenhang zwischen dem erhöhten Nachweis dieser Genklasse und Heterosis geschlossen werden. Ähnlich hierzu konnte von Vuylsteke *et al.* (2005) in *Arabidopsis* eine signifikante Anreicherung von Genen, die mit Signaltransduktion in Verbindung stehen, unter den nicht additiv exprimierten Genen, die in Blättern der Hybride identifiziert wurden, nachgewiesen werden.

Ein weiterer hoher Anteil von 38% der klassifizierbaren Sequenzen des Gen-Sets des differentiellen Screenings (Tab. 4) zeigte Homologien zu Genen mit einer höchst wahrscheinlich regulatorischen Funktion. Diese Klone wurden verschiedenen funktionellen Kategorien zugeordnet und zeigten vornehmlich Homologie zu Genen, die wahrscheinlich an der Transkriptions- und Translationsregulation beteiligt sind, aber auch zu Genen, welche bei der Initiation der DNA-Replikation, beim Protein- und RNA-Umsatz oder der zellulären Dynamik eine Rolle spielen.

Auch in dem Set von Genen, die mit nicht subtrahierten Sonden im Embryogewebe der Genotypkombination UH301/UH005 als differentiell exprimiert identifiziert wurden (Tab. 11), konnten 27,6% der klassifizierbaren Sequenzen auf Grund der festgestellten Homologien mit Proteinen, die eine regulatorischen Funktion besitzen, in Verbindung gebracht werden.

Ähnlich wie die Gene des differentiellen Screenings wurden diese Gene auf Grund ihrer funktionellen Zugehörigkeit in verschiedene Kategorien eingestuft. Die Gene sind wahrscheinlich hauptsächlich in der Transkriptionsregulation, aber auch in der Translationsregulation und in der Kontrolle des Zellzyklus involviert. Ferner wird auf der Basis der Homologien auch eine Beteiligung an der hormonellen Regulation und der Regulation auf der DNA-Ebene angenommen.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass diese Ergebnisse deutlich auf einen Zusammenhang hinweisen zwischen der beobachteten Heterosis in sechs *dap* Embryonen und Genen, die eine Verbindung zu regulatorischen Prozessen und Prozessen der Signaltransduktion besitzen. Auch in anderen Arbeiten konnten Anhaltspunkte für die Verbindung von Heterosis mit regulatorischen Prozessen und der Signaltransduktion gefunden werden. Wu *et al.* (2003) und Yao *et al.* (2005) konnten in Blatt bzw. Blatt und Wurzel von Weizen zwischen Inzucht- und Hybridpflanzen differentiell exprimierte Transkriptionsfaktoren nachweisen. Ferner sind viele QTLs, für die die molekulare Basis bekannt ist, transkriptionale Faktoren oder Mitglieder der Signaltransduktionskaskaden (Birchler, 2001).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten durch die Untersuchungen von Embryogewebe der interpool Genotypkombination UH301/UH005 12 putative Transkriptionsfaktoren (15,8% der klassifizierbaren Gene) als Heterosis assoziiert nachgewiesen werden (Kapitel 3.6.1). In den Arbeiten von Yao *et al.* (2005), die auch die SSH-Methode nutzten, um differentiell exprimierte Gene anzureichern, besaßen nur 9 von 134 klassifizierbaren Gene (6,7%) eine Homologie zu Transkriptionsfaktoren. Der stark erhöhte Anteil dieser regulierenden Gene in sechs *dap* Embryogewebe könnte möglicherweise in Zusammenhang stehen mit der Manifestierung von Heterosis in diesem frühen Stadium der Entwicklung. Weitere Untersuchungen von anderen Genotypkombinationen in der frühen Entwicklung sind jedoch notwendig, um konkrete Einsichten in Hinblick auf die Manifestierung von Heterosis zu erhalten.

#### 4.2.5 *Dwarf8* – Indiz für die Beteiligung der hormonellen Regulation an Heterosis

Im Rahmen der Genexpressionsanalysen mit dem Heterosis-3k-Array wurden Gene identifiziert, die in beiden untersuchten Geweben oder Genotypkombination in jeweils mindestens drei der vier Inzucht-Hybrid-Vergleiche differentiell exprimiert waren (Kapitel 3.5.2). Diese Gene stellen auf Grund der gezeigten Kontinuität in der differentiellen Genexpression interessante Ansatzpunkte für weiterführende Untersuchungen dar. Die Gene *dwarf8*, AD9, DD6, DH2, KG5, NF10 und TH5 wurden in den Inzucht-Hybrid-Vergleichen speziell im Endospermgewebe beider Genotypkombination UH301/UH005 und UH250/UH301 mehrfach als differentiell exprimiert detektiert. *Dwarf8* ist aufgrund seines Expressionsprofils, das auf der Basis der Microarrayanalysen festgestellt wurde (Kapitel 7.3: Tab. 21), besonders auffallend. Für das *dwarf8* Gen konnte festgestellt werden, dass es im Endosperm der Inzuchtlinien UH301 und UH005 nahezu gleich exprimiert ist. Die Analysen zeigten aber in den Endospermgeweben der Hybriden beider Genotypkombinationen eine stärkere Expression im Vergleich zu den Inzuchtlinien auf, was auf eine generell überdominante Expression hindeutet. Bei dem *dwarf8* Gen aus Mais handelt es sich um ein orthologes Gen zu dem Gibberellin insensitiven Gen (*gai*) aus *Arabidopsis* (Peng *et al.*, 1999), dessen Genprodukt ein Transkriptionsfaktor ist und als negativer Regulator der Gibberellinantwort fungiert (Peng *et al.*, 1999; Andersen *et al.*, 2005). Mutationen im Gen *dwarf8* sind dominant und führen zu einem schweren Zwergwuchs der Pflanzen (Kende, 2001).

Aktive Gibberelline sind essentiell für die Regulation des normalen Pflanzenwachstums (Hooley, 1994). Aus diesem Grund waren verschiedene Arbeitsgruppen der Ansicht, dass der Gibberellin Gehalt für das kraftvolle Pflanzenwachstum, das mit Heterosis assoziiert ist, verantwortlich sein könnte (Paleg, 1965; Rood *et al.*, 1988; Sarkissian *et al.*, 1964). Diese Ansicht wurde unterstützt durch die Beobachtung, dass Maisinzuchtpflanzen empfänglicher für die Gabe von exogenem Gibberellin A<sub>3</sub> (synthetisches Analog zu GA<sub>1</sub>) waren als die Hybriden (Nickerson, 1959; Rood *et al.*, 1983; 1990).

Auger *et al.* testeten 2005, ob Gibberellin für das erhöhte Wuchsverhalten der Hybride verantwortlich ist. Ihre Ergebnisse demonstrierten, dass Hybrid-*dwarf1*-Pflanzen, die keine bioaktiven Gibberelline synthetisieren können, relativ zu ihren normalen „Schwesterpflanzen“ keine Einbußen an Heterosis zeigten. Auger *et al.* 2005 schlossen daraus, dass die Modulation von bioaktiven Gibberellinen nicht die hauptsächliche Ursache für die heterotische Reaktion ist.

Wie dem auch sei, die generell erhöhte Expression des *dwarf8* Gens im sechs dap Endospermgewebe der Hybridpflanzen im Vergleich zu den Inzuchtlinien, die unabhängig von der Genotypkombination festgestellt wurde, zeigt für dieses Gen, das an der hormonellen Regulation in Pflanzen beteiligt ist, eine mögliche Verbindung zu Heterosis auf. Interessant ist, dass auch im sechs dap Embryogewebe vier Gene mit differentieller Expression zwischen den untersuchten Genotypen der interpool Kreuzung UH301/UH005 nachgewiesen wurden, die auf Grund ihrer Homologie einen Zusammenhang mit der hormonellen Regulation, hier in Hinblick auf Auxin und Abscisinsäure, vermuten lassen (Tab. 11).

#### 4.2.6 Chromatingene unterschiedlicher Funktionsklassen zeigen Heterosis assoziierte Expression

Eine Vielzahl von Analysen der letzten Jahrzehnte legte dar, dass die pure DNA-Sequenz nicht alle Informationen trägt, die benötigt werden, um den Phänotyp eines Organismus festzulegen (Grant-Downton und Dickinson, 2005). Studien in Hefen und Tieren haben die besondere Rolle der Chromatinstruktur in der Kontrolle der Genexpression aufgezeigt (Reyes, 2006). Chromatin modifizierende Proteine sind für die Regulation der Genexpression und für die Etablierung der epigenetischen Markierungen, die vererbt werden können, essentielle (Reyes, 2006). In den letzten Jahren wurde eine große Anzahl von putativ Chromatin assoziierten Proteinen entdeckt, die neben der gametophytischen oder embryonalen Entwicklung auch eine Vielzahl anderer biologischer Prozesse kontrollieren (Fukaki *et al.*, 2006; Reyes, 2006).

Da alle Gene der F1-Hybriden durch die elterlichen Inzuchtlinien gegeben sind und sich die Hybridleistung trotzdem deutlich von der Leistung der Eltern abhebt (Yao *et al.*, 2005), ist es denkbar, dass epigenetische Informationen, die durch Chromatin assoziierte Proteine erzeugt werden, für die Ausprägung von Heterosis entscheidend sind. Auger *et al.* (2004) testeten in Mais die Hypothese eines möglichen metastabilen (vererbaren) epigenetischen Anteils von Heterosis durch Induktion von haploiden Pflanzen und konnten keine Indizien dafür nachweisen.

In verschiedenen Studien zur Heterosis assoziierten Genexpression (Kollipara *et al.*, 2002; Yao *et al.*, 2005; Swanson-Wagner *et al.*, 2004) konnten allerdings erste Anhaltspunkte für eine mögliche Beteiligung der Chromatin assoziierten Proteine an Heterosis durch die Identifikation einiger Chromatingene gefunden werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zum ersten Mal 168 Chromatingene aus Mais über Microarray- und qRT-PCR-Expressionsanalysen gezielt in Hinblick auf eine Heterosis assoziierte Genexpression untersucht (Kapitel 7.2: Tab. 19; [www.chromdb.org](http://www.chromdb.org)). Für insgesamt 33 dieser Chromatingene und 5 weitere Gene, die Homologien zu Chromatin assoziierten Proteinen zeigten, konnte eine Heterosis assoziierte Expression auf der Basis einer signifikant differentiellen Genexpression zwischen den Genotypen der interpool Kreuzung UH301/UH005 festgestellt werden (Kapitel 3.5.3: Tab. 9; Kapitel 7.3: Tab. 22).

Die Identifikation der 5 Gene mit Homologie zu Chromatin assoziierten Proteinen zeigt auf, dass es mit dem gewählten methodischen Ansatz in diesem frühen Stadium der Entwicklung ohne Überprüfung der 168 Chromatingene möglich gewesen wäre, deutliche Hinweise auf eine Heterosis assoziierte Expression dieser Genklasse zu finden. Swanson-Wagner *et al.* (2006) konnten im Vergleich dazu bei der Untersuchung von 14 Tage alten Maiskeimlingen der Inzuchtlinien B73 und Mo17 sowie des Hybrids Mo17xB73 durch Microarrayanalysen auf der Basis von 13999 cDNAs nur zwei Chromatingene als im Hybrid erhöht exprimiert detektieren.

Durch die Überprüfung der 168 Genfragmente der Chromatin assoziierten Proteine konnten für die frühe Entwicklung von Embryo- und Endospermgewebe, die möglicherweise für die Ausprägung von Heterosis entscheidend sein kann, erweiterte Einblicke in das Spektrum der

putativ Heterosis assoziierten Chromatingene gewonnen werden. Die Zuordnung der insgesamt 38 differentiell exprimierten Chromatingene in verschiedene Funktionsklassen zeigt auf, dass sowohl allgemein regulierende, Histon modifizierende und Chromatin remodulierende Gene als auch Strukturgene von einer unterschiedlichen Expression in den Inzuchtlinien und reziproken Hybriden betroffen sind (Kapitel 3.5.3: Tab. 9).

15 der 38 Chromatingene zeigten in sechs dap Embryogewebe eine differentielle Expression, 29 Chromatingene in sechs dap Endospermgewebe, wobei in beiden Geweben ein ungefähr gleicher Anteil der differentiell exprimierten Gene in die Funktionsklassen „Allgemein regulierende Enzyme“, „Histon modifizierende Enzyme“, „Chromatin remodulierende Enzyme“ und „Strukturgene“ eingestuft werden konnte (Kapitel 3.5.3: Tab. 9). Es ist daher möglich, dass in Bezug auf die Genregulation in beiden Geweben ähnliche Mechanismen genutzt werden, die durch gewebespezifische Proteine ausgeführt werden. Diese Vermutung wird dadurch unterstützt, dass im selben Gewebe der beiden untersuchten Genotypkombinationen (UH301/UH005, UH250/UH301) die gleichen differentiell exprimierten Gene nachgewiesen werden konnten (Kapitel 3.5.3: Tab. 9).

In den Expressionsanalysen konnten weitaus mehr (44,7%) differentiell exprimierte Gene mit einer putativen Histon modifizierenden Funktion detektiert werden als solche, die eine strukturgebende Funktion (26,3%) besitzen. Zu den Histon modifizierenden Enzymen gehörten 2 Histonacetyltransferasen, 5 Histondeacetylase, 9 SET-Proteine und ein Protein mit methylbindendem Proteinbereich (Kapitel 3.5.3). Yao *et al.* 2005 konnten bei der Untersuchung der Heterosis assoziierten Genexpression in Wurzeln und Blättern von Weizenkeimlingen ebenfalls die differentielle Expression eines Gens nachweisen, das eine hohe Homologie zu einer Histondeacetylase aus Mais aufwies. Diese Histondeacetylase gehört wie auch das Protein ZmHda1 aus Mais zu derselben RPD3/HDA1 Superfamilie wie die im Rahmen dieser Arbeit identifizierte Histonacetylase HDA117, deren Gen sowohl in Embryo- als auch Endospermgewebe als differentiell exprimiert detektiert wurde (Kapitel 3.5.3: Tab. 9). In Endospermgewebe des Hybrids 301x005 konnte für die Histonacetylase HDA117 eine signifikant unterdominante Expression nachgewiesen werden (Kapitel 3.5.3: Tab. 8). Die in Weizenkeimlingen identifizierte Histonacetylase war im Gegensatz dazu im Hybrid hochreguliert (Yao *et al.*, 2005).

Die Histonacetylierung bzw. -deacetylierung, die durch Histonacetyltransferasen bzw. Histondeacetylasen katalysiert wird, beeinflusst die Zugänglichkeit der Chromatin-DNA für RNA-Polymerasen (Yao *et al.*, 2005). Für ZmHda1 konnte gezeigt werden, dass das Enzym in Mais effektiv die Transkription reprimiert (Pipal *et al.*, 2003).

Im Gegensatz zum Gen *hda117*, das eine verminderte Expression im Endospermgewebe des Hybrids 301x005 zeigte, ist das Gen der ebenfalls identifizierte Histondeacetylase HDA113, die der SIR2 Familie angehört, im Endospermgewebe des gleichen Hybrids signifikant überdominant exprimiert (Kapitel 3.5.3: Tab. 8). Die SIR2 (silent information Regulator 2) Histonacetylase wurde in Hefe entdeckt (Denu, 2003), wo das Protein die Genstilllegung an den Telomeren veranlasst (Aparicio *et al.*, 1991; Strahl-Bohlsinger *et al.*, 1997; Gottschling *et al.*, 1990). An den Telomeren ist SIR2 Teil eines Multienzymkomplex (Aparicio *et al.*, 1991; Strahl-Bohlsinger *et al.*, 1997), der zur Stabilität und Aufrechterhaltung der Telomer-

wiederholungen gebraucht wird (Palladino *et al.*, 1993). Eine erhöhte Dosis des SIR2 Gens führt zu einer verlängerten Lebensspanne in Hefe (Kaeberlein *et al.*, 1999) und *Caenorhabditis elegans* (Guarente, 2000; 2001), wohingegen eine Deletion des SIR2 Gens in Hefe die Lebensspanne verkürzt (Kaeberlein *et al.*, 1999).

Chromatin assoziierte Proteine und genregulatorische Moleküle sind darauf ausgerichtet, in Komplexen aus vielen Untereinheiten in dem Prozess zur Kontrollierung der Genexpression zu wirken. Zunehmende Beweise legen nahe, dass durch die Veränderung der Menge eines der Mitglieder eines solchen Komplexes die Funktion/Effizienz des gesamten Komplexes durch die Kinetik der Assemblierung und anderen Aktionen beeinflusst wird (Birchler *et al.*, 2007; 2005). Zwischen den Inzuchtlinien und den reziproken Hybriden auftretende Genexpressionsveränderungen welcher Natur auch immer, können daher bei dieser Genklasse drastische Folgen haben, da genregulatorische Hierarchien in Eukaryoten empfindsam gegenüber der Gendosis sind und Veränderungen in einzelnen Komponenten einen Effekt auf den Phänotyp ausüben können (Birchler *et al.*, 2005).

Am Beispiel der Funktion der SIR2 Histonacetylase in Hefe kann zum einem nachvollzogen werden, wie stark der Einfluss einer veränderten Expression eines einzelnen Chromatingens auf den Organismus ist, zum anderen wird deutlich, dass Histonacetylasen sehr spezielle Einsatzgebiete haben können. Möglicherweise führt das klar umgrenzte Einsatzspektrum der einzelnen Histon modifizierenden Enzyme, das spezifische Chromatindomänen umfasst (Grozinger und Schreiber, 2002), dazu, dass eine höhere Anzahl an Genen dieser Funktionsklasse als putativ Heterosis assoziiert identifiziert wurde, da verschiedenste Enzyme für die unterschiedlichen Genregulationen gebraucht werden.

Typischerweise ist Euchromatin assoziiert mit acetylierten Histonen und am Lysinrest 4 zweifach methyliertem Histon H3. Heterochromatin ist im Gegensatz dazu assoziiert mit Histon H3 Proteinen, die am Lysinrest 9 zweifach methyliert sind (Lippman *et al.*, 2004). SET-Proteine führen als Lysin-Methyltransferasen die Histonmethylierung durch, wobei die zweifache Methylierung am Lysinrest 4 des Histon H3 (Couture *et al.*, 2006) bzw. die zweifache Methylierung am Lysinrest 9 des Histon H3 (Zhang *et al.*, 2002) auf unterschiedliche SET-Proteine zurückgeht. Im Rahmen dieser Arbeit konnten insgesamt 9 SET-Proteine als differentiell exprimiert identifiziert werden (Kapitel 3.5.3: Tab. 9), was auf eine mögliche Beteiligung dieser Histon modifizierenden Enzyme an der nachgewiesenen Hybridvitalität von sechs *dap* Embryonen und Endosperm verweist.

Die Position von Histonen und Nukleosomen auf einem Stück DNA kann wie eine räumliche Blockierung wirken und den Zugang von Transkriptionsfaktoren zu Promotoren behindern (Aalfs und Kington, 2000). Remodulierende Komplexe sind gekennzeichnet durch eine heterogene Assemblierung von Chromatin modifizierenden Proteinen und stehen oft in Kooperation mit Transkriptionsfaktoren. Diese Komplexe können dadurch die lokale Struktur von DNA/Nukleosomen-Komplexen verändern, dass die Nukleosomen entlang der DNA an eine veränderte Position gerückt werden (Aalfs und Kington, 2000; Owen-Hughes, 2003). Dies kann die Zugänglichkeit von zuvor blockierten Transkriptionsorten ermöglichen bzw. das Gegenteil bewirken (Grant-Downton und Dickinson, 2005). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten insgesamt 4 Untereinheiten von Chromatin remodulierenden Komplexen, ein

Klon mit Homologie zu dem Chromatin remodulierenden Faktor CHD3 sowie 4 globale Transkriptionsfaktoren mit einer differentiellen Expression zwischen den Genotypen der interpool Kreuzung UH301/UH005 nachgewiesen werden (Kapitel 3.5.3: Tab. 9.; Kapitel 7.3: Tab. 22). Eine Beteiligung der Chromatin remodulierenden Enzyme, aber auch der Transkriptionsfaktoren an den Heterosis begleitenden Mechanismen ist daher denkbar.

Interessant ist, dass auf der Basis der Microarrayanalysen mit dem Heterosis-3k-Array für Chromatingene mit modifizierender, remodulierender oder regulierender Funktion hauptsächlich eine über- bzw. unterdominante Expression im Embryo- als auch im Endospermgewebe der Hybride nachgewiesen werden konnte (Kapitel 3.5.3: Tab. 8). Dieses Expressionsverhalten verweist auf genregulatorische Interaktionen, die zwischen den Allelen der im Hybrid kombinierten Genome stattgefunden haben müssen.

Im Gegensatz dazu wiesen vor allem strukturgebende Proteine in sechs dap Hybridgeweben ein additives Expressionsmuster auf (Kapitel 3.5.3: Tab. 8), obwohl auch für einige wenige SET-Proteine eine zum elterlichen Durchschnitt gleiche Expression in sechs dap Embryo- und Endospermgewebe der Hybriden festgestellt werden konnte (Kapitel 3.5.3).

Zu den im Rahmen dieser Arbeit identifizierten strukturgebenden Proteine, deren Gene vorwiegend additiv exprimiert waren, gehörten die Histone H2A, H2B, H3 sowie zwei Einzel-myb-Histone, drei Proteine der Klasse „High Mobility Group family B“ und zwei Nukleosomen/Chromatin assemblierende Faktoren (Kapitel 3.5.3: Tab. 9). Swanson-Wagner *et al.* 2006 wies in 14 Tage alten Maiskeimlingen das Histon H2B und einen Nukleosomen/Chromatin assemblierenden Faktor der Gruppe D als im Hybrid Mo17xB73 höher exprimiert nach. Yao *et al.* 2005 konnte in Wurzeln und Blättern von Weizenkeimlingen feststellen, dass die Histone H1, H2B-1, H2B-2, H2B-6 und H2B153 in Hybriden hochreguliert waren. Sie schlussfolgerten, dass das erhöhte Expressionsniveau der Histone in Hybriden möglicherweise zu der erhöhten Wachstumsrate der Hybride beiträgt. Kollipara *et al.* (2002) konnte ferner bei der Analyse von Maiskeimlingen nachweisen, dass das Histon H2B unterschiedlich zwischen den reziproken Hybriden Mo17xB73 und B73xMo17 exprimiert wird. In Embryonen des späten R5 Entwicklungsstadiums waren ferner die Histone H2B und H4 unterschiedlich in den reziproken Hybriden Mo17xB73 und B73xMo17 exprimiert (Kollipara *et al.*, 2002).

Auch wenn die Ergebnisse der verschiedenen Studien zur Heterosis assoziierten Genexpression in Bezug auf die Expression der strukturgebenden Proteine in Hybriden unterschiedlich sind, so zeigt doch die übereinstimmende Identifikation der strukturgebenden Chromatingene eine mögliche Verbindung zu Heterosis auf.

In Hinblick auf Heterosis müssen weitere Analysen folgen, um die räumliche und zeitliche Choreographie zwischen spezifischen Transkriptionsfaktoren, Chromatin modifizieren und strukturgebenden Proteinen, die die Regulation der Genexpression ermöglichen, zu verstehen.

#### 4.2.7 Transposition gibt Hinweise in Bezug auf Stilllegungsmechanismen

Interessanterweise konnte im Rahmen der Expressionsanalysen mit dem Heterosis-3k-Array festgestellt werden, dass in Embryo- wie auch Endospermgewebe der verschiedenen Genotypen der interpool Kreuzung UH301/UH005 sowohl transponierbare Elemente als auch Proteingene, die mit der Transposition in Zusammenhang stehen, unterschiedlich exprimiert waren (Kapitel 3.5.4; Kapitel 7.3: Tab. 24 ).

Bei den transponierbaren Elementen handelt es sich mit Ausnahme von *Cin4* um verschiedene LTR-Retrotransposons. Dies sind DNA-Sequenzen, die von direkten, langen terminalen Wiederholungen („long terminal repeats“, LTR) flankiert werden und gewöhnlicher Weise alle Proteine, die für die Transposition und Integration des Retrotransposons gebraucht werden, codieren (Wessler, 2001). Das Transpositionsintermediat, eine RNA-Zwischenstufe, wird durch Transkription des LTR-Retrotransposons gebildet (Wessler, 2001). Mindestens 60% des Maisgenoms setzt sich aus Retrotransposons zusammen, von denen einige eine Kopienanzahl von bis zu 20.000 pro haploides Genom aufweisen (SanMiguel und Bennetzen, 1998). Die meisten dieser hoch repetitiven Retrotransposons liegen zwischen den Genen und werden unter den meisten physiologischen Bedingungen auf einem sehr geringen Niveau oder gar nicht exprimiert (Avramova *et al.*, 1995; Bennetzen, 1996; Meyers *et al.*, 2001). Im Genom seltener vorkommende Retrotransposons sind im Gegensatz dazu vergleichsweise häufiger über die RNA-Zwischenstufe nachweisbar (Meyers *et al.*, 2001). Bei den im Rahmen dieser Arbeit identifizierten Retrotransposons handelt es sich sowohl um solche, die in geringer Kopienanzahl im Genom vorliegen (*Stonor*: Marillonnet und Wessler, 1998; *Reina*: Meyers *et al.*, 2001) als auch solche, die häufig vorkommen (*CentA*: Ananiev *et al.*, 1998; *Opie*: Marillonnet und Wessler, 1998; *Cinful*: Sanz-Alferez *et al.*, 2003).

Transposition allgemein stellt eine Art zweiseitige Medaille für den Organismus dar. Zum einen ist Transposition vorteilhaft, da sie zur Evolution der Genome beiträgt (Bennetzen, 2000; Kumar und Bennetzen, 1999). Fu und Dooner (2002) konnten nachweisen, dass sich Retrotransposoncluster in verschiedenen Maisinzuchtlinien merklich unterscheiden, nicht nur in der Zusammensetzung, sondern auch in der Position relativ zu Genen. Es gibt sogar Hinweise dafür, dass Transposons und repetitive DNA eine Hauptrolle bei der Erzeugung der allelischen Diversität spielen (Springer und Stupar, 2007), da repetitive Sequenzen in *cis* Einfluss auf das Expressionsniveau nahe gelegener Gene oder ganzer Genregionen nehmen (Stam *et al.*, 2002; Clark *et al.*, 2006) oder transponierbare Elemente durch Integration in regulierende Gensequenzen eine veränderte Expression auslösen können (Sommer *et al.*, 1988). Transposition ist folglich durch die Erzeugung von Diversität auch in Hinblick auf Heterosis positiv zu diskutieren (Springer und Stupar, 2007).

Zum anderen ist Transposition für das Individuum selbst nachteilig, da mit der Transposition eine zum Teil negativ veränderte Genexpression, Chromosomenbrüche oder Rearrangements des genetischen Materials einhergehen können (Wessler, 2001). Deshalb haben die Pflanze Mechanismen entwickelt, die durch Methylierung der DNA-Sequenz der transponierbaren Elemente die Transposition verhindern (Tran *et al.*, 2005).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit haben gezeigt, dass in dem untersuchten frühen Stadium der Entwicklung sowohl in Embryo- als auch Endospermgewebe eine Expression dieser unterschiedlichen transponierbaren Elemente nachzuweisen war. Da auch Lai *et al.* (2004) bei der Charakterisierung des Maisendospermtranskriptoms in einem vergleichbaren Stadium transponierbare Elemente identifizierte, Yao *et al.* (2005) bei der Sequenzierung von 748 zwischen Hybriden und Inzuchtlinien differentiell exprimierten cDNAs in Weizenkeimlingen jedoch keine transponierbaren Elemente nachwies, ist es denkbar, dass die Detektion von differentiell exprimierten Retrotransposontranskripten vornehmlich in der frühen Embryogenese möglich ist.

In dem untersuchten frühen Stadium der Entwicklung konnte der Hinweis auf eine Heterosis assoziierte Expression der Retrotransposons gefunden werden. In Endospermgewebe des Hybrids 301x005 wurden die Elemente *CentA*, *Cin4*, *Opie*, *Prem-2* und *Stonor* signifikant seltener exprimiert, wodurch ein unterdominantes Expressionsverhalten nachweisbar war (Kapitel 3.5.4: Tab. 10). In Pflanzen wird die Stilllegung von transponierbaren Elementen durch DNA-Methylierung erreicht (Tran *et al.*, 2005), die die Aktivität von DNA-Methyltransferasen voraussetzt und in Zusammenhang steht mit der Rekrutierung von Proteinkomplexen, die an der methylierten DNA binden (Reyes, 2006). Es ist daher denkbar, dass die abgeschwächte Expression im Hybrid auf eine im Vergleich zu den Inzuchtlinien veränderte Expression bestimmter Chromatin assoziierter Proteine zurückgeht, wodurch eine verbesserte Stilllegung der transponierbaren Elemente ermöglicht wird.

Die im Embryogewebe über qRT-PCR Expressionsanalysen festgestellten Expressionsmuster des Retrotransposons *Reina* und des Gens TF6 (Kapitel 3.5.4), die in den reziproken Hybriden eine additive bzw. dominante Expression aufzeigten, könnten wegen der Unterschiedlichkeit des Expressionsverhaltens beider Gene auf die Beteiligung eines sequenzspezifischen Mechanismus zur Stilllegung dieser Elemente verweisen. Derzeitige Arbeiten in *Arabidopsis* haben die siRNA-Maschinerie mit einer gewissen *de novo* Methylierung in Verbindung gebracht (Cao *et al.*, 2003; Chan *et al.*, 2004; Zilberman *et al.*, 2003), wobei siRNAs einen speziellen Stilllegungskomplex leiten, der die Unterdrückung der Transposonaktivität zum Ziel hat und somit zur Genomstabilität beiträgt (Zilberman *et al.*, 2003).

Der in *Arabidopsis* entdeckte Stilllegungskomplex, der speziell RNA-gewiesene DNA-Methylierung durchführt, setzt sich unter anderem aus einem Dicer-like 3 Protein, der RNA-abhängigen RNA-Polymerase 2, der RNA-Polymerase IV und dem AGO4 Protein zusammen (Xie *et al.*, 2004; Zilberman *et al.*, 2003; Herr *et al.*, 2005; Onodera *et al.*, 2005). Mutationen in diesen Proteinen können zu verringerter siRNA Akkumulation, verringerter AGO4 Stabilität (Li *et al.*, 2006) und einer verringerten DNA-Methylierung an vielen endogenen Genorten, die Transposons und repetitive Sequenzen einschließen, führen (Xie *et al.*, 2004; Zilberman *et al.*, 2003; Herr *et al.*, 2005; Onodera *et al.*, 2005; Lippman *et al.*, 2003; Chan *et al.*, 2004; Zilberman *et al.*, 2004). Daher ist es in Hinblick auf das Expressionsverhalten von *Reina* und TF6 denkbar, dass sequenzspezifische Genstilllegungssysteme während der Einrichtung des allelischen Zusammenspiels der Genome in der frühen Entwicklung die Stilllegung der jeweiligen transponierbaren Sequenzen in Hybriden unterschiedlich gut vermitteln, da Sequenzvariationen in beiden Inzuchtlinien vorliegen können und/oder das

spezielle Stilllegungssystem der jeweiligen Inzuchtlinie unterschiedlich effizient Stilllegung ermöglicht. Bemerkenswert ist in dem Zusammenhang, dass in sechs dap Endospermgewebe Hinweise dafür gefunden wurden, dass ein zu AGO4 homologes Protein in den untersuchten Maisinzuchtlinien differentiell exprimiert wurde (Kapitel 7.3: Tab. 22, 23).

#### **4.2.8 Genregulatorische Interaktionen sind in sechs dap F1-Embryonen nachweislich erhöht**

Gemäß Birchler *et al.* (2003) sind im Hybrid zwei gegensätzliche Möglichkeiten denkbar, um Heterosis unter molekularen Gesichtspunkten zu erklären: Auf der einen Seite eine kombinierte, allelisch additive Expression beider Genome auf einem dem elterlichen Durchschnitt ähnlichem Niveau - auf der anderen Seite Expressionsniveaus, die im Vergleich zum elterlichen Durchschnitt auf Grund von Interaktionen zwischen den kombinierten Genomen verändert sind.

Informationen über relative Genexpressionsniveaus der beiden reziproken Hybride und elterlichen Inzuchtlinien in der frühen Entwicklung sind deshalb so interessant, weil in *Arabidopsis* und Mais der Beginn und das Ausmaß des väterlichen Beitrags zur embryonalen Genexpression kontrovers diskutiert wird. Anzeichen für eine im Ganzen um mehrere Tage verzögerte Aktivierung des väterlichen Genoms in *Arabidopsis* stehen Berichten einer frühen paternalen Aktivität einiger Gene gegenüber (Vielle-Calzada *et al.*, 2000; 2001; Weijers *et al.*, 2001). Wie dem auch sei, sechs Tage nach der Bestäubung konnten durch die Expressionsanalysen mit Microarray und qRT-PCR keine generelle Tendenz zu maternalen Expressionsniveaus festgestellt werden, wie es zu erwarten wäre, wenn die paternale Genomaktivierung verzögert wäre.

Es konnten vielmehr durch die Identifikation von semidominanten, dominanten und überdominanten sowie unterdominanten Genexpressionsmustern in sechs dap Embryo- und Endospermgewebe der Hybride genregulatorische Interaktionen aufgezeigt und somit zu diesem Zeitpunkt der Entwicklung die Aktivität beider Genome nachgewiesen werden.

Durch die qRT-PCR Expressionsuntersuchungen von 31 differentiell exprimierten, zufällig ausgewählten Genen, die unterschiedlichste Homologien zeigten, konnte festgestellt werden, dass 43,5% der untersuchten Gene in sechs dap Embryonen signifikant ( $P \leq 0,15$ ) nicht additiv exprimiert wurden (Kapitel 3.6.2). Swanson-Wagner *et al.* (2006) konnten im Vergleich dazu auf der Basis von Microarrayanalysen mit 14 Tage alten Keimlingen nur 22% signifikant ( $P \leq 0,15$ ) nicht additiv exprimierte Gene detektieren, obwohl ähnlich wie in der vorliegenden Arbeit alle möglichen Arten der Genexpression beobachtet wurden. Auch Stupar und Springer (2006) wiesen bei Microarrayanalysen mit unreifen Kolben, 19 dap Embryonen und 11 Tage alten Keimlingen ungefähr 20% nicht additive Expression nach. Da beide Arbeiten, genauso wie die vorliegende Arbeit, in Mais durchgeführt wurden, aber auf dem Vergleich von Hybrid- und Inzuchtgewebe eines späteren Entwicklungsstadiums beruhen, kann vermutet werden, dass der erhöhte Anteil an nicht additiver Genexpression, der in sechs dap F1-

Embryonen nachgewiesen wurde, möglicherweise in Zusammenhang steht mit den Vorgängen zur Manifestierung von Heterosis in der frühen Entwicklung. Da in den Untersuchungen von Uzarowska *et al.* (2006) auf der Basis von isoliertem Maisapikalmeristem ebenfalls ein hoher Anteil der differentiell exprimierten Gene (88,6%) Überdominanz bzw. partielle oder vollständige Dominanz zeigte, könnte die erhöhte Detektion von nicht additiver Genexpression tatsächlich durch den frühen Entwicklungs- bzw. geringen Differenzierungsstatus der untersuchten Gewebe bedingt sein.

Wie dem auch sei, auch Auger *et al.* (2005) konnten bei der Untersuchung von 30 Genen über radioaktive Markierung der RNA von Hybriden und Inzuchtlinien in Blattgewebe ausgewachsener Maispflanzen in den reziproken Hybriden 20 bzw. 19 Gene mit einer nicht additiver Expression identifizieren.

Interessant ist, dass in den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten qRT-PCR Expressionsanalysen festgestellt werden konnte, dass sich die reziproken Hybride in Bezug auf die realisierten Expressionsmuster unterschieden. Während im Hybrid 005x301 56,3% der mit Hilfe der qRT-PCR Analysen untersuchten 31 Gene eine nicht additive Expression aufwiesen, waren es 28,1% im Hybrid 301x005. Kollipara *et al.*, (2002) konnten bei der Untersuchung von reziproken Maishybriden, die unterschiedliche Phänotypen in Bezug auf Kältekeimung und Austrocknungstoleranz zeigten, starke Expressionsunterschiede nachweisen. Daher ist es denkbar, dass die in Kapitel 3.1.1 gezeigten unterschiedlichen Größenzuwachsraten, die sich in den MH-Werten widerspiegeln, durch unterschiedliches Expressionsverhalten der Hybride bedingt sein könnten. Das 005x301 Hybrid, bei dem im Vergleich zum reziproken Hybrid doppelt so viele der untersuchten Gene eine nicht additive Expression zeigten, wies einen deutlich erhöhten MH-Wert im Vergleich zum 301x005 Hybrid auf (Abb. 7). Bemerkenswert ist, dass die im Hybrid 005x301 zusätzlich nicht additiv exprimierten Gene fast ausschließlich eine Homologie zu Proteinen mit einer regulierenden Funktion aufwiesen (Tab. 12). Da gemäß Birchler *et al.* (2005) genregulatorische Hierarchien in Eukaryoten empfindsam gegenüber der Gendosis sind und Veränderungen in einzelnen Komponenten einen Effekt auf den Phänotyp haben können, wären weitere Analysen wünschenswert, die den Zusammenhang zwischen dem veränderten Expressionsverhalten regulatorischer Gene in reziproken Hybriden und heterotischen Merkmalen untersuchen.

Die im Rahmen dieser Arbeit mit der Microarraytechnik durchgeführten Expressionsanalysen (Kapitel 3.5) legen dar, dass zahlreiche Gene in sechs *dap* Hybriden im Vergleich zu den elterlichen Inzuchtlinien differentiell exprimiert sind. Nicht additive Genexpressionsmuster lassen zwischen den elterlichen Genomen in *trans* wirkende regulatorische Mechanismen zu diesem Zeitpunkt der Entwicklung erkennen, da dominante und überdominante Expressionsmuster nicht durch eine Addition der allelischen Expression erklärt werden können.

Tatsächlich konnte durch allelspezifische Expressionsanalysen von 20 Genen (Kapitel 3.7), die Homologien zu Proteinen mit unterschiedlichster Funktionen aufwiesen und unterschiedlich stark zwischen den elterlichen Inzuchtlinien UH301 und UH005 in sechs *dap* Embryonen exprimiert waren, nur bei 5 bzw. 4 Genen in den sechs *dap* Hybridembryonen

301x005 und 005x301 eine ausschließliche *cis*-Regulation festgestellt werde. 13 der 20 Gene wurden als *cis/trans*-reguliert eingestuft, wobei ein deutlicher *trans*-Einfluss nachgewiesen werden konnte (Abb. 26). Stupar und Springer (2006) konnten im Gegensatz dazu zeigen, dass ein Hauptteil der allelischen Expressionsvariationen in späteren Entwicklungsstadien von Mais seine Ursache in *cis*-regulatorischen Variationen der Allele hat. Ihre Ergebnisse basieren auf allelspezifische Expressionsanalysen von 27 differentiell exprimierten Genen, die in unbefruchteten Kolben, 11 Tage alten Keimlinge und 19 dap Embryonen der reziproken Maishybride B73xMo17 und Mo17xB73 durchgeführt wurden. Auf der Grundlage von 35 Analysen konnten Stupar und Springer (2006) 18 Genen als *cis*-reguliert, ein Gen als *trans*-reguliert und insgesamt 13 Gene als *cis/trans*-reguliert klassifizieren, wobei die Expression diese 13 Gene stärker durch *cis* beeinflusst war. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten allelspezifischen Untersuchungen der Genexpression von acht dap Embryonen zeigten, dass im Vergleich zu sechs dap Embryonen mehr als doppelt so viele Genen als ausschließlich *cis*-reguliert eingestuft werden konnten und der *cis*-Einfluss auch bei den *cis/trans*-regulierten Genen zunahm. Es ist daher denkbar, dass in frühen Stadien der Entwicklung in *trans* wirkende Faktoren einen größeren Einfluss auf die Genexpression haben als in späteren. Ein in der Embryogenese stattfindender Wandel der Regulationseinflüsse würde erklären, warum die Ergebnisse nicht nur von Stupar und Springer (2006), sondern auch von Schadt *et al.* (2003) und Guo *et al.* (2004) darauf hindeuten, dass in Mais ein großer Anteil der intraspezifischen Unterschiede in den Genexpressionsniveaus *cis*-regulatorischen Variationen zugeschrieben werden können.

Der Vergleich der in der vorliegenden Arbeit gezeigten Ergebnisse mit Wittkopp *et al.* (2004) verweist ebenso wie der Vergleich mit der Untersuchung von Stupar und Springer (2006) darauf, dass in sechs dap F1-Embryonen in erhöhtem Maße *trans*-Regulation festgestellt wurde. Wittkopp *et al.* (2004) konnten in *Drosophila* zeigen, dass *cis*-regulatorische Unterschiede sehr häufig zwischen orthologen Genen verschiedener Arten vorkommen und interspezifische Expressionsunterschiede in F1-Hybriden nahezu ausschließlich durch *cis*-regulatorische Änderungen in Strukturgenen verursacht werden.

Möglicherweise steht die in sechs dap F1-Embryonen in erhöhtem Maße festgestellte *trans*-Regulation, die nachweislich mit detektierten nicht additiven Expressionsmustern in Verbindung gebracht werden konnte (Kapitel 3.7.3: Tab. 14), in Zusammenhang mit der Etablierung einer kombinierten Expression der elterlichen Allele und somit mit der Manifestierung von Heterosis in der frühen Entwicklung.

#### 4.2.9 Möglichkeit zur Initialisierung von Heterosis bereits in der Zygote

Die Aktivierung des väterlichen Genoms kennzeichnet den Übergang von der mütterlichen zur embryonalen Kontrolle der Entwicklung und den Beginn des aus sich selbst heraus bestimmten Entwicklungsprogramms (Grimanelli *et al.*, 2005), das für die Ausprägung von Heterosis grundlegend ist.

Es konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass die kombinierte Aktivität der elterlichen Genome der F1-Hybridembryonen schon sechs Tagen nach der Bestäubung zu

messbarer Hybridvitalität führt (Kapitel 3.1.1). Diese Detektion von Heterosis setzt eine bereits abgeschlossene Initialisierung der erhöhten Wachstumsrate unter Beteiligung der beiden genetisch verschiedenen Genome voraus. Da selbst bei einer sehr stark erhöhten Zellteilungsrate in F1-Hybriden Zeit vergeht bis Größenunterschiede von bis zu 180% zwischen dem Hybrid und der maternalen Inzuchtlinie entstehen, müssen die Heterosis einleitenden Prozesse, die eine paternale Genomaktivierung voraussetzen, extrem früh in der Embryogenese beginnen. Die in wissenschaftlichen Publikationen vorherrschend vertretende Meinung der verzögerten Aktivierung des väterlichen Genoms in Angiospermen (Vielle-Calzada *et al.*, 2000; Baroux *et al.*, 2001; Grimanelli *et al.*, 2005) in Analogie zum tierischen System (Sawicki *et al.*, 1981; Bensaude *et al.*, 1983; Matsumoto *et al.*, 1994; Nothias *et al.*, 1996) steht der Etablierung von Heterosis assoziierten Expressionsmustern in der frühen Embryogenese jedoch entgegen.

Die allelspezifischen Expressionsanalysen dieser Arbeit (Kapitel 3.7) zeigen eindeutig, dass die Aktivierung des paternalen Genoms vor der ersten Zellteilung noch in der Zygote in *Zea mays* vollzogen wird. Ferner konnte gezeigt werden, dass von der frühen paternalen Genomaktivierung nicht nur Mitglieder einer bestimmten Proteinfamilie bzw. Proteine mit einer spezifischen Funktion oder Lokalisierung im Genom betroffen sind. Daher kann die frühe Aktivierung des gesamten männlichen Genoms in *Zea mays* angenommen werden.

In Kontrast zu diesem Resultat stehen die Ergebnisse von Grimanelli *et al.*, die 2005 von 16 früh exprimierten endogenen Genen ausschließlich Transkripte mütterlicher Allele in den ersten drei Tage nach der Befruchtung in Mais detektieren konnten. Grimanelli *et al.* verwendeten zur Überprüfung der paternalen Genomaktivität wegen der schwierigen Isolierung von drei *dap* Embryonen und Endosperm Ovarien, die vom Perikarp und extranuzellaren Zellschichten getrennt wurden, aber vornehmlich maternales sporophytisches Gewebe enthielten. Die methodisch bedingte Nachweisgrenze von 1:100 könnte der Grund dafür gewesen sein, dass bei der Analyse dieses Materials eine Detektion von Transkripten der paternalen Allele nicht möglich war. Auf Grund der gründlichen Trennung der untersuchten Zygoten und Embryonen von dem umgebenden mütterlichen Gewebe (Abb. 29A) durch die Mikrodissektionstechnik konnte der unerwünschte Einfluss von zusätzlichen maternalen Transkripten in der allelspezifischen Expressionsanalyse, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurde, jedoch ausgeschlossen werden.

Wegen der Detektion ausschließlich maternaler Genprodukte bis zum Midglobularstadium in *Arabidopsis*, vermuten Vielle-Calzada *et al.* (2000), dass der größte Teil, wenn nicht das gesamte väterliche Genom zunächst stillgelegt wird. Walbot und Evans diskutierten 2003, dass diese verzögerte paternale Genomaktivierung als verlängerte haploide Phase Vorteile für die natürliche Selektion haben könnte. Da im Rahmen der vorliegenden Arbeit bei 20 untersuchten Genen die Aktivität der paternalen Allele nachweisbar war, kann für Mais eine das gesamte väterliche Genom betreffende Stilllegung jedoch ausgeschlossen werden. Dies steht in Einklang mit den Ergebnisse von Scholten *et al.*, die 2002 mittels *in vitro* Fertilisation und RT-PCR zeigen konnten, dass neu transkribierte *gfp*-mRNA 4 Stunden nach der Befruchtung einer Mais Wildtyp-Eizelle mit einer *gfp*-transgenen Spermazelle detektierbar war. Da die frühe Aktivität des paternalen Genoms mit der Dekondensation des männlichen

Chromatins einherging, konnte von Scholten *et al.* bereits 2002 die frühe Zugänglichkeit des männlichen Genoms für die transkriptionale Maschinerie in Mais nachgewiesen werden.

Sechs Gene zeigten in den allelspezifischen Expressionsanalysen (Kapitel 3.7.3) eine vornehmliche Expression nur eines Allels oder die ausschließliche Expression des Allels UH005 unabhängig vom elterlichen Ursprung. Die charakteristische Expression dieser Gene bewies, dass bereits in Zygoten ein gleichwertiges Potential der elterlichen Genome vorlag, da das Allel unabhängig vom elterlichen Ursprung das Maß der transkriptionalen Aktivität in Hybriden vorgab. Dieses Ergebnis steht in Kontrast zu der Auffassung von Vielle-Calzada *et al.* (2000). Sie vertraten den Standpunkt, dass dem mütterlichen Genom eine zentrale Rolle in der Regulation der frühen Embryogenese zukomme und die frühe Embryo- und Endospermentwicklung hauptsächlich unter maternaler Kontrolle stehe.

Durch den Vergleich der allelspezifischen Transkripthäufigkeiten in den reziproken Hybriden, die abgesehen vom elterlichen Ursprung der Allele genetisch identisch sind, konnten elterliche Effekte, die auf das relative Transkriptniveau Einfluss nahmen, abgeleitet werden. Auf Grund des bedeutenden Größenunterschiedes zwischen Eizelle und Spermazelle (Kranz und Kumlehn, 1999), der auf eine Differenz zwischen den mitgeführten Transkriptmengen schließen läßt, und der Tatsache, dass nur das väterliche Genom vor dem Beginn der transkriptionalen Aktivität decondensiert wird (Scholten *et al.*, 2002), war ein verstärktes Auftreten von maternalen Transkripten in der frühen Entwicklung zu vermuten.

Tatsächlich konnte bei 12 Genen festgestellt werden, dass die Transkripthäufigkeit in Zygoten signifikant maternalen Effekten unterlag. Diese maternalen Effekte führten zu einer Beeinflussung, die zwischen 4,7% und 37,4% lag und durchschnittlich 19,6% betrug. Diese im Grunde gering erhöhte mütterliche Transkriptmenge zeigt deutlich den starken Einfluss, den das väterliche Genom bereits vor der ersten Zellteilung besitzt. Diese Einschätzung wurde durch die gering, aber signifikant, erhöhte Transkripthäufigkeit des väterlichen Allels eines Gens in beiden untersuchten Hybriden und das Fehlen signifikanter elterlicher Einflüsse bei 7 der 20 untersuchten Gene unterstützt. Drei Tage nach der Bestäubung war der maternale Einfluss auf die allelische Expression weiter verringert und in sechs dap Embryonen waren elterliche Effekte selten signifikant oder nur schwach detektierbar.

Diese Ergebnisse zeigen, dass in der frühen Entwicklung eine ursprungsabhängige Vormachtstellung der allelischen Transkripte nur für einige Gene in unerwartet geringem Ausmaß auftrat, während für andere Gene noch vor der ersten Zellteilung keinerlei Beeinflussung durch den elterlichen Ursprung der Allele nachzuweisen war.

Baroux *et al.* (2001) kamen in *Arabidopsis* durch ihrer Studien zur Transgen-Aktivierung nach der Befruchtung zu einem anderen Ergebnis. Sie konnten zwar die frühe transkriptionale Aktivität des Barnase Gens zeigen, waren allerdings auf Grund weiterer Studien mit dem Reporter-gen *uidA* der Ansicht, dass väterlich vererbte Gene, sofern sie nach der Befruchtung aktiv sind, zunächst eine verminderte Expression zeigen. Die väterliche Expression würde dann im Zuge der Entwicklung graduell ansteigen, um ca. im Midglobularstadium das mütterliche Niveau zu erreichen (Baroux *et al.*, 2001).

Zusammenfassend zeigen die Daten, dass in Mais die elterlichen Genomaktivitäten schon vor der ersten Zellteilung der Zygote nahezu gleichwertig sind und die schwache Präferenz für maternale Transkripte innerhalb der ersten sechs Tage nach der Befruchtung verloren geht. Die im Rahmen dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse zeigen deutlich, dass die in der Literatur diskutierten globalen Stilllegungsmechanismen für das väterliche Genom (Baroux *et al.*, 2001; Chaudhury *et al.*, 2001; Vielle-Calzada *et al.*, 2000) in *Zea mays* nicht etabliert sind. Scholten *et al.* (2002) konnten in Mais 6 h nach der Befruchtung eine translationale Aktivität auf der Basis von *gfp*-Signalen messen. Die Arbeitsgruppe zeigte damit, dass in *Zea mays* anders als in der Maus (Matsumoto *et al.*, 1994; Nothias *et al.*, 1996) die Expression zygotischer Gene nicht durch eine Abkopplung der Transkription von der Translation verzögert ist. Folglich kann die Embryonalentwicklung in Mais umgehend nach der Fusion der Gameten und der Dekondensierung des parentalen Genoms von beiden elterlichen Genomen kontrolliert werden. Wesentliche Voraussetzungen für Heterosis sind somit in *Zea mays* bereits vor der ersten Zellteilung in der Zygote gegeben.

## **5 Zusammenfassung**

Heterosis bezeichnet eine erhöhte Vitalität, die nur bei mischerbigen Pflanzen und Tieren auftritt und zu erheblichen Ertragssteigerungen führen kann. Obwohl Heterosis seit einem Jahrhundert in der Landwirtschaft extensiv eingesetzt wird, ist die molekulare Basis des Phänomens bislang weitgehend ungeklärt.

Ziel dieser Arbeit war es, Heterosis in der frühen Kornentwicklung von Mais, kurz nachdem zwei unterschiedliche Genome durch die Befruchtung vereint wurden und gemeinsam die Entwicklung des Embryos und Endosperms steuern, zu untersuchen. Neben einer phänotypischen Charakterisierung zur Bestimmung des Ausmaßes von Heterosis in diesen beiden Geweben sollten assoziierte Gene, deren Expressionsmuster, sowie deren Regulation analysiert werden. Die Identifikation und Charakterisierung von Heterosis assoziierten Genen und Expressionsmustern sollte den Einstieg zur Erforschung von regulatorischen Netzwerken und Mechanismen ermöglichen, die für die Ausprägung des Phänomens von Bedeutung sind.

Zwei dent Inzuchtlinien und eine flint Inzuchtlinie mit unterschiedlicher genetischer Distanz und deren heterozygoten Nachkommen, die Heterosis verschieden stark ausprägen, bildeten die Basis für die Untersuchungen dieser Arbeit. Das diploide Embryogewebe und triploide Endosperm wurden getrennt analysiert, um Unterschiede, die durch die verschiedenen genomischen Verhältnisse bedingt sind, aufzeigen zu können.

Die gezielte Isolation der Gewebe durch Mikrodissektion gewährleistete eine genaue phänotypische Charakterisierung und eine hohe Sensitivität in den molekularen Untersuchungen. Zur Identifikation von differentiell exprimierten Genen zwischen Hybrid- und Inzuchtgeweben wurde eine hoch effiziente PCR basierte cDNA-Subtraktionsmethode mit Microarrayhybridisierungen, die die gleichzeitige Untersuchung von tausenden Genen gestatten, kombiniert. Die Subtraktionsmethode ermöglichte die Anreicherung von stärker oder ausschließlich exprimierten cDNAs der Hybrid- bzw. Inzuchtgewebe. Angereicherte cDNA-Banken und -Populationen wurden sowohl zur Herstellung eines cDNA-Microarrays als auch in einem differentiellen Screening eingesetzt. Um in der frühen Entwicklung möglichst aussagekräftige Expressionsanalysen zwischen den Inzucht- und Hybridgenotypen durchführen zu können, wurde ein fokussiertes, 3000 cDNAs umfassendes Array produziert, in dem Genfragmente der frühen Embryogenese und Chromatin assoziierter Proteine zusammengestellt wurden. Da quantitative RT-PCR die sensitivste Technik zur Bestimmung der Transkriptmengen ist, wurde diese Methode zur Validierung der Microarraydaten und zur Erfassung von Expressionsmustern genutzt. Allelspezifische Analysen dienten dazu, die Expression der elterlichen Allele in Hybriden zu untersuchen, um Aussagen über Regulationsmechanismen und die paternale Genomaktivierung zu ermöglichen.

Für Hybridembryonen wurde eine erhöhte Zellteilungsrate gezeigt, die bereits 6 Tage nach der Befruchtung zu erheblichen Größenunterschieden gegenüber den Elternlinien führt. Die Größenzunahme war signifikant, beständig nachweisbar und betrug maximal 180% im

Vergleich zur mütterlichen Inzuchtlinie. Geringere Zuwachsraten und eine stark mütterlich geprägte Größe waren für das Endospermgewebe der Hybride feststellbar.

Sechs Tage nach der Befruchtung weist die Existenz der heterotischen Merkmale auf eine veränderte Genexpression in Hybridgeweben hin, die durch den Vergleich mit der Genexpression der elterlichen Inzuchtlinien sowohl im differentiellen Screening als auch in den Untersuchungen mit dem fokussierten Microarray nachgewiesen werden konnte.

Im Embryo konnte eine Assoziation von Heterosis mit Genen, die mit der Signaltransduktion und anderen regulatorischen Prozessen in Verbindung stehen, durch den verstärkten Nachweis differentiell exprimierter Gene dieser funktionellen Klassen festgestellt werden.

Im Endospermgewebe der Hybride wurde sechs Tage nach der Befruchtung vorwiegend dosisabhängige Genexpression nachgewiesen, aber auch ein deutlicher Einfluss der väterlichen Allele gezeigt.

Ein Indiz für die Beteiligung der hormonellen Regulation an Heterosis war die Identifikation der differentiellen Expression des Gens *dwarf8*, ein orthologes Gen zu dem Gibberellin insensitiven Gen aus *Arabidopsis*. *Dwarf8* wies in allen Hybrid-Inzucht-Vergleichen ein überdominantes Expressionsverhalten in den Endospermgeweben der Hybride auf.

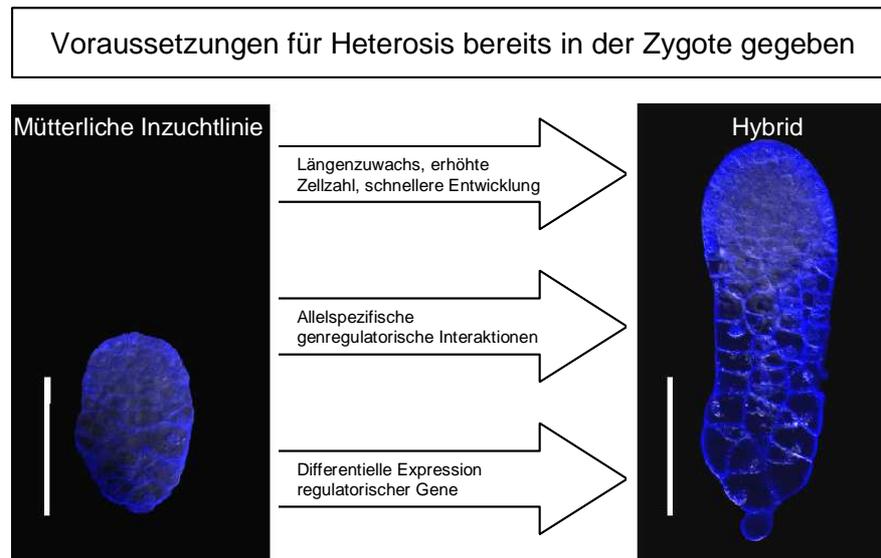
Eine Beteiligung epigenetischer Mechanismen an den transkriptionalen Veränderungen zwischen Hybriden und Inzuchtlinien deutet sich durch die Heterosis assoziierte Expression von 38 Chromatingenen in Embryo- und Endospermgewebe an. Während Gene strukturgebender Chromatin assoziierter Proteine eine vorwiegend additive Expression zeigten, konnte für Chromatingene mit modifizierender, remodulierender oder regulierender Funktion eine hauptsächlich über- bzw. unterdominante Expression in Hybriden nachgewiesen werden.

Allelische genregulatorische Interaktionen in Embryo- und Endospermgewebe der Hybride konnten durch den Nachweis dominanter und überdominanter Genexpressionsmuster übereinstimmend in den Expressionsanalysen des differentiellen Screenings, der Microarray-hybridisierungen und der quantitativen RT-PCR Untersuchungen aufgezeigt werden.

Durch allelspezifische Analysen von 20 Genen, konnten Heterosis assoziierten Genexpressionsmustern in sechs und acht Tage alten Embryonen eine regulatorische Basis zugeordnet werden. Diese Daten deckten eine Regulationsumstellung in diesem Zeitraum auf. Während in sechs Tage alten Hybridembryonen eine stark *trans*-regulierte Expression festgestellt wurde, war diese in acht Tage alten Embryonen vorwiegend *cis*-geprägt. Diese Regulationsumstellung deutet auf molekulare Prozesse der frühen Embryogenese hin, die mit der Justierung einer kombinierten Expression der elterlichen Allele und damit auch mit der Etablierung von Heterosis in Zusammenhang stehen.

Gleichwertige elterliche Genomaktivitäten konnten in *Zea mays* schon vor der ersten Zellteilung sowie in drei und sechs Tage alten Embryonen durch allelspezifische Expressionsanalysen von 20 Genen gezeigt werden. Eine schwache Präferenz für maternale Transkripte verringerte sich schnell und ist sechs Tage nach der Befruchtung vollständig aufgehoben.

Diese Ergebnisse zeigen, dass in Mais die Embryonalentwicklung umgehend nach der Befruchtung durch beide elterlichen Genome kontrolliert wird. Damit sind wesentliche Voraussetzungen für Heterosis bereits in der Zygote gegeben und bieten eine Erklärung für die beachtlichen Größenunterschiede zwischen Hybridembryonen und Embryonen der mütterlichen Inzuchtlinie in der frühen Kornentwicklung.



**Abbildung 30: Heterosis in der frühen Embryonalentwicklung von *Zea mays* L.** Gezeigt sind ein repräsentativer Embryo der mütterlichen Inzuchtlinie und ein Hybridembryo, die sechs Tage nach der Befruchtung isoliert wurden. Erkenntnisse, die in Bezug auf Heterosis für Embryogewebe im Rahmen dieser Arbeit gewonnen wurden, sind dargestellt. Die Pfeile zeigen Hybridcharakteristika auf bzw. deuten eine putative Einflussnahme auf die Entwicklung des Hybridembryos an. Der Maßstab gibt jeweils 100µm wieder.

## 6 Literaturverzeichnis

- Aalfs, J. D. und Kingston, R. E.** (2000) What does 'chromatin remodeling' mean? *Trends in Biochem. Sciences* 25:548-555
- Abbe, E. C. und Stein, O. L.** (1954) The growth of the shoot apex in maize: embryogeny. *Am J Bot* 41:285-293
- Adams, K. L., Cronn, R., Percifield, R., Wendel, J. F.** (2003) Genes duplicated by polyploidy shows unequal contributions to the transcriptome and organ-specific reciprocal silencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100:4649-4654
- Adams, S., Vinkenoog, R., Spielmann, M., Dickinson, H. G., Scott, R. J.** (2000) Parent-of-origin effects on seed development in *Arabidopsis thaliana* require DNA methylation. *Development* 127:2493-2502
- Allshire, R.** (2002) RNAi and Heterochromatin – a Hushed-Up Affair. *Science* 297:1818-1819
- Al-TaHER, A., Bashein, A., Nolan, T., Hollingsworth, M., and Brady, G.** (2000) Global cDNA amplification combined with real-time RT-PCR: accurate quantification of multiple human potassium channel genes at the single cell level. *Yeast* 17:201-210.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D. J.** (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402
- Ananiev, E. V., Phillips, R. L., Rines, H. W.** (1998) Chromosome-specific molecular organization of maize (*Zea mays* L.) centromeric regions. *Proc Natl Acad Sci USA* 95(22):13073-13078
- Andersen, J. R., Schrag, T., Melchinger, A. E., Zein, I., Lübberstedt, T.** (2005) Validation of Dwarf8 polymorphisms associated with flowering time in elite European inbred lines of maize (*Zea mays* L.). *Theor Appl Genet.* 111(2):206-217
- Aparicio, O. M. et al.** (1991) Modifiers of position effect are shared between telomeric and silent mating-type loci in *S. cerevisiae*. *Cell* 66:1279-1287
- Ashby, E.** (1930) Studies in the inheritance of physiological characters. I. A physiological investigation of the nature of hybrid vigor in maize. *Ann Bot XLIV*: 457-468
- Ashby, E.** (1932) Studies in the inheritance of physiological characters. II. Further experiments upon the basis of hybrid vigor and upon the inheritance of efficiency index and respiration rate in maize. *Ann Bot XLVI*:1007-1032
- Auger, D. L., Gray, A. D., Ream, T. S., Kato, A., and Coe, E. H.** (2005) Non-additive gene expression in diploid and triploid hybrids of maize. *Genetics* 169:389-397
- Auger, D. L., Peters, E. M., Birchler, J. A.** (2005) A Genetic Test of Bioactive Gibberellins as Regulators of Heterosis in Maize. *Journal of Heredity* 96(5):614-617
- Auger, D. L., Ream, T. S., Birchler, J. A.** (2004) A test for a metastable epigenetic component of heterosis using haploid induction in maize. *Theor Appl Genet* 108:1017-1023
- Avramova, Z., SanMiguel, P., Georgieva, E., Bennetzen, J. L.** (1995) Matrix attachment regions and transcribed sequences within a long chromosomal continuum containing maize *adh1*. *Plant Cell* 7:1667-1680
- Bao, J., Lee, S., Chen, C., Zhang, X., Zhang, Y., Liu, S., Clark, T., Wang, J., Cao, M., Yang, H., Wang, S. M., Yu, J.** (2005) Serial analysis of gene expression study of a hybrid rice strain (LYP9) and its parental cultivars. *Plant Physiol* 138:1216-31
- Baroux, C., Blanvillain, R. & Gallois, P.** Paternally inherited transgenes are down-regulated but retain low activity during early embryogenesis in *Arabidopsis*. *FEBS Letters* 509, 11-16 (2001).
- Baroux, C., Spillane, C., Grossniklaus, U.** (2002) Genomic imprinting during seed development. *Adv.Genet.* 46:165-214
- Bassani, M., Neumann, P. M., Gepstein, S.** (2004) Differential expression profiles of growth-related genes in the elongation zone of maize primary roots. *Plant Mol. Biol.* 56:367-380

- Ben, C., Hewezi, T., Jardinaud, M. F., Bena, F., Ladouce, N., Moretti, S., Tamborindeguy, C., Liboz, T., Petitprez, M., Gentzbittel, L.** (2005) Comparative analysis of early embryonic sunflower cDNA libraries. *Plant Mol Biol* 57:255-70
- Benjamini, Y. und Hochber, Y.** (1995) Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J Roy Stat Soc* 57:289-300
- Bennetzen, J. L.** (1996) The contributions of retroelements to plant genome organization, function and evolution. *Trends Microbiol.* 4:347-353
- Bennetzen, J. L.** (2000) Transposable element contributions to plant gene and genome evolution. *Plant Mol. Biol.* 42:251-269
- Bensaude, O., Babinat, C., Morange, M., Jacob, F.** (1983) Heat shock proteins, first major products of zygotic gene activity in mouse embryo. *Nature* 305, 331-333
- Berger, F.** (2004) Plant sciences. Imprinting – A green variation. *Science* 303:483-485
- Birchler, J. A.** (1993) Dosage analysis of maize endosperm development. *Annu. Rev. Genet.* 27:181-204
- Birchler, J. A., Bhadra, U., Pal-Bhadra, M., Auger, D. L.** (2001) Dosage dependent gene regulation in higher eukaryotes: implikations for dosage compensation, aneuploid syndromes and quantitative traits. *Dev. Biol.* 234:275-288
- Birchler, J. A., Riddle, N. C., Auger, D. L., Veitia, R. A.** (2005) Dosage balance in gene regulation: biological implications. *Trends Genet.* 21(4):219-226
- Birchler, J.A., Auger, D.L., Riddle, N.C.** (2003) In search of the molecular basis of heterosis. *Plant Cell* 15, 2236-2239
- Birchler, J.A., Yao, H., Chudalayandi, S.** (2007) Biological consequences of dosage dependent gene regulatory systems. *Biochimica et Biophysica Acta*, doi:10.1016/j.bbaexp.2006.12.002
- Bird, A., P. und Wolffe, A. P.** (1999) Methylation-induced repression-belts, braces, and chromatin. *Cell* 24:451-454
- Brink, R. A. und Cooper, D. C.** (1947) The endosperm in seed development. *Bot. Rev.* 13:423-541
- Bruce, A.B.** (1910) The Mendelian theory of heredity and the augmentation of vigor. *Science* 32: 627-628.
- Buchholz, J.T.** (1945) Embryological aspects of hybrid vigor in pines. *Science* 102(2641):135-142
- Cao, W., Epstein, C., Liu, H** (2004) Comparing gene discovery from Affymetrix GeneChip microarrays and Clontech PCR-select cDNA subtraction: a case study. *BMC Genomics* 5:26
- Cao, X., Aufsatz, W., Zilberman, D., Mette, M. F., Huang, M. S., Matzke, M., Jacobsen, S. E.** (2003) Role of the DRM and CMT3 methyltransferases in RNA-directed DNA methylation. *Curr Biol* 13:2212-2217
- Chan, S. W., Zilberman, D., Xie, Z., Johansen, L. K., Carrington, J. C., Jacobsen, S. E.** (2004) RNA Silencing genes control *de novo* DNA methylation. *Science* 303:1336
- Chaudhury AM, Berger F** (2001) Maternal control of seed development. *Semin Cell Dev Biol* 12:381-6
- Chaudhury, A. M., Koltunow, A., Payne, T., Luo, M., Tucker, M. R., Dennis, E. S., Peacock, W. J.** (2001) Control of Early Seed Development. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 17:677-699
- Clark, R. M., Wagler, T. N., Quijada, P., Doebley, J.** (2006) A distant upstream enhancer at the maize domestication gene *tb1* has pleiotropic effects on plant and inflorescent architecture. *Nat. Genet.* 38:594-597
- Clore, A.M., Dannenhoffer, J. M., Larkins, B. A.** (1996) EF-1 $\alpha$  is associated with a cytoskeletal network surrounding protein bodies in maize endosperm cells. *Plant Cell* 8:2003-2014
- Cockerham, C. C. und Zeng, Z. B.** (1996) Design III with marker loci. *Genetics* 143:1437-1456
- Costa, L.M. Gutiérrez-Marcos, J.F., Dickinson H.G.** (2004) More than a yolk: the short life and complex times of the plant endosperm. *Trends Plant Sci.* 9, 507-514
- Couture, J. F., Collazo, E., Hauk, E., Trivel, R. C.** (2006) Structural basis for the methylation site specificity of SET7/9. *Nat Struct Mol Biol.* 13(2):140-146
- Crow, J. F.** (1948) Alternative hypotheses of hybrid vigor. *Genetics* 33:477-487

- Crow, J. F.** (1998) Perspectives: 90 Years Ago: The Beginning of Hybrid Maize. *Genetics* 148:923-928
- Davenport, C. B.** (1908) Degeneration, albinism and inbreeding. *Science* 28:454-455
- Denu, J. M.** (2003) Linking chromatin function with metabolic networks: Sir2 family of NAD<sup>+</sup>-dependent deacetylases. *Trends Biochem Sci.* 28:41-48
- Desai, S., Hill, J., Trelogan, S., Diatchenko, L., Siebert, P. D.** (2000) Identification of differentially expressed genes by suppression subtractive hybridization (SSH). In: *Functional Genomics, Eds. Hunt, S. P. & Livesey, F. J., Oxford University Press.* pp. 81-112.
- Diatchenko, L., Lau, Y. F. C., Campbell, A.P.** (1996) Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 93:6025-6030
- Diatchenko, L., Lukyanov, S., Lau, Y.F., Siebert, P. D.** (1999) Suppression subtractive hybridization: a versatile method for identifying differentially expressed genes. *Methods Enzymol* 303: 349-380.
- Diévert, A. und Clark, S. E.** (2004) LRR-containing receptors regulating plant development and defense. *Dev.* 131:251-261
- Ding, C.** (2006) Qualitative and quantitative DNA and RNA analysis by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Methods Mol. Biol.* 336, 59-71
- Doebley, J. und Lukens, L.** (1998) Transkriptional rgulators and the evolution of plant form. *Plant Cell* 12:1551-1568
- Drews, G. N., Lee, D., Christensen, C. A.** (1998) Genetic Analysis of Female Gametophyte Development and Function. *Plant Cell* 10:5-17
- Duvick, D. N.** (1977) Genetic rates of gain in hybrid maize yields during the past 40 years. *Maydica* 22:187-196
- Duvick, D. N.** (1999) Heterosis: Feeding People and Protecting Natural Resources. *The Genetics and Exploitation of Heterosis in Crops, eds. Coors, J.G. & Pandey, S. (Crop Sci. Soc. Amer., Madison, WI)*, 19-29
- East, E. M.** (1908) Inbreeding in corn. Rep. Conn. Agric. Exp. Stn. pp. 419-428
- East, E.M.** (1936) Heterosis. *Genetics* 21: 375-397.
- Endege, W. O., Steinmann, K. E., Boardman, L. A., Thibodeau, S. N., Schlegel, R.** (1999) Representative cDNA libraries and their utility in gene expression profiling. *BioTechniques* 26, 542-550.
- Faure, J.E., Digonnet, C., Dumas, C.** (1994) An *in vitro* system for adhesion and fusion of maize gametes. *Science* 263:1598-1600
- Fu, H., and Dooner, H. K.** (2002) Intraspecific violation of genetic colinearity and its implications in maize. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 9573-9578.
- Fukaki, H., Taniguchi, N., Tasaka, M.** (2006) PICKLE is required for SOLITARY-ROOT/IAA14-mediated repression of ARF7 and ARF19 activity during Arabidopsis lateral root initiation. *Plant Journal* 48:380-389
- Gardmo, C., Swerdlow, H. and Mode, A.** (2002) Growth hormone regulation of rat liver gene expression assessed by SSH and microarray. *Mol. Cell Endocrinol.* 190: 125-133.
- Gardner, C. O.** (1963) Estimates of genetic parameters in cross fertilizing plants and their implications to plant breeding, pp. 225-252 in *Statistical Genetics and Plant Breeding*, edited by W. D. Hanson and H. F. Robinson. *Special Publ. 982, NAS-NRC, Washington.*
- Gehring, M., Choi, Y., Fischer, R. L.** (2004) Imprinting and seed development. *Plant Cell* 16(suppl.):S203-S213
- Germain H, Rudd S, Zotti C, Caron S, O'Brien M, Chantha SC, Lagace M, Major F, Matton DP** (2005) A 6374 unigene set corresponding to low abundance transcripts expressed following fertilization in *Solanum chacoense* Bitt, and characterization of 30 receptor-like kinases. *Plant Mol Biol* 59:515-532
- Gibson, G., Riley-Berger, R., Harshman, L., Kopp, A., Vagha, S.** (2004) Extensive sex-specific non-additivity of gene expression in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 167:1791-1799

- Ginzinger, D. G.** (2002) Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream. *Exp Hematol* 30:503-512
- Goldberg, R. B., de Paiva, G., Yadegari, R.** (1994) Plant embryogenesis: Zygote to seed. *Science* 266:605-614
- Gottschling, D. E. et al.** (1990) Position effect at *S. cerevisiae* telomeres: reversible repression of Pol II transcription. *Cell* 63:751-762
- Grant-Downton, R. T. und Dickinson, H. G.** (2005) Epigenetics and its Implications for Plant Biology. 1. The Epigenetic Network in Plants. *Annals of Botany* 96:1143-1164
- Grimanelli, D., Perotti, E., Ramirez, J., Leblanc, O.** (2005) Timing of the maternal-to-zygotic transition during early seed development in maize. *Plant Cell* 17, 1061-1072
- Grozinger, C. M. und Schreiber S. L.** (2002) Deacetylase enzymes: biological functions and the use of small-molecule inhibitors. *Chem. Biol.* 9:3-16
- Guarente, L.** (2000) SIR2 links chromatin silencing, metabolism, and aging. *Genes Dev.* 14:1021-1026
- Guarente, L.** (2001) SIR2 and aging - the exception that proves the rule. *Trends Genet.* 17:391-392
- Guo M, Rupe MA, Yang X, Crasta O, Zinselmeier C, Smith OS, Bowen B** (2006) Genome-wide transcript analysis of maize hybrids: allelic additive gene expression and yield heterosis. *Theor Appl Genet* DOI 10.1007/s00122-006-0335-x
- Guo, M., Rupe, M. A., Danilevskaya, O. N., Yang, X., Hu, Z.** (2003) Genome-wide mRNA profiling reveals heterochronic allelic variation and a new imprinted gene in hybrid maize endosperm. *Plant J.* 36, 30-44.
- Guo, M., Rupe, M. A., Zinselmeier, C., Habben, J., Bowen, B. A., Smith O. S.** (2004) Allelic variation of gene expression in maize hybrids. *Plant Cell* 16, 1707-1716.
- Guo, M., Rupe, M., Smith, H., Yang, S., Bowen, B., Crasta, O.** (2001) Genome-wide allele-specific regulation and heterosis in maize hybrids. *Maize Genetics Conference Abstracts* 43: P94.
- Guyomarc'h, S., Bertrand, C., Delarue, M. und Zhou, D. X.** (2005) Regulation of meristem activity by chromatin remodeling. *Trends Plant Sci.* 10:332-338
- Hämmerle, B und Ferrus, R.** (2003) Expression of enhancers is altered in *Drosophila melanogaster* hybrids. *Evol. Dev.* 5:221-230
- Hedgecock, D., Lin, J. Z., DeCola, S., Haudenschild, C. D., Meyer, E., Manahan, D. T., Bowen, B.** (2007) Transcriptomic analysis of growth heterosis in larval Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *PNAS* 104(7):2313-2318
- Herr, A. J., Jensen, M. B., Dalmay, T., Baulcombe, D. C.** (2005) RNA polymerase IV directs silencing of endogenous DNA. *Science* 308:118-120
- Hoecker N, Keller B, Piepho HP, Hochholdinger F** (2005) Manifestation of heterosis during early maize (*Zea mays* L.) root development. *Theor Appl Genet* 12:421-9
- Hong, S. K., Kitano, H., Satoh, H., Nagato, Y.** (1996) how is the embryo size genetically regulated in rice? *Development* 122:2051-2058
- Hooley, R.** (1994) Gibberellins: perception, transduction and responses. *Plant Mol Biol.* 26(5):1529-1555
- Huang, Y., Zhang, L., Zhang, J., Yuan, D., Xu, C., Li, X., Zhou, D., Wang, S., Zhang, Q.** (2006) Heterosis and polymorphisms of gene expression in an elite rice hybrid as revealed by microarray analysis of 9198 unique ESTs. *Plant Mol Biol* 62(4-5):579-591
- Inoue, H., Nojima, H., Okayama, H.** (1990) High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96:23-28
- Jones, P. L., Veenstra, G. J., Wade, P. A., Vermaak, D., Kass, S. U., Landsberger, N., Strouboulis, J., Wolffe, A. P.** (1998) Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nat. Genet.* 19:187-191

- Jullien, P. E., Kinoshita, T., Ohad, N., Berger, F.** (2006) Maintenance of DNA Methylation during the *Arabidopsis* Life Cycle is Essential for Parental Imprinting. *Plant Cell* 18:1360-1372
- Kaeberlein, M. et al.** (1999) The SIR2/3/4 complex and SIR2 alone promote longevity in *Saccharomyces cerevisiae* by two different mechanisms. *Genes Dev.* 13:2570-2580
- Kang, G. H., Foley, R. C., Onate-Sanchez, L., Lin, C., Singh, K. B.** (2003) Target genes for OBP3, a Dof transcription factor, include novel basic helix-loop-helix domain proteins inducible by salicylic acid. *Plant J.* 35:362-372
- Kass, S. U., Landsberger, N., Wolffe, A. P.** (1997) DNA methylation directs a time-dependent repression of transcription initiation. *Curr. Biol.* 7:157-165
- Keeble, F. und Pellew, C** (1910) The mode of inheritance of stature and of time of flowering in peas (*Pisum sativum*). *J. Genet.* 1: 47-56.
- Keller, B., Emrich, K., Hoecker, N., Sauer, M., Hochholdinger, F., Piepho, H. P.** (2005) Designing a microarray experiment to estimate dominance in maize (*Zea mays L.*). *Theor Appl Genet* 111:57-64
- Kempton, J. H. und McLane, J.W.** (1942) Hybrid vigor and weight of germs in the seeds of maize. *J Agric. Res.* 64:65-80
- Kende, H.** (2001) Hormone response mutants. A Plethora of Surprises. *Plant Physiology* 125:81-84
- Kerr, M. K., Mitchell, M., Churchill, G. A.** (2000) Analysis of variance for gene expression microarray data. *J Comp Biology*, 7:819-837
- Kiesselbach, T. A.** (1922) Corn investigations. *Bull Agric Experiment Station Nebraska* 20:5-151
- Kinoshita, T., Yadegari, R., Harada, J. J., Goldberg, R. B., Fischer, R. L.** (1999) Imprinting of the MEDEA Polycomb Gene in the *Arabidopsis* Endosperm. *Plant Cell* 11:1945-1952
- Kollipara, K. P., Saab, I. N., Wych, R. D., Lauer, M. L., Singletary G. W.** (2002) Expression profiling of reciprocal maize hybrids divergent for cold germination and desiccation tolerance. *Plant Physiology* 129: 974-992.
- Kranz, E. und Dresselhaus, T.** (1996) *In vitro* fertilisation with isolated higher plant gametes. *Trends Plant Sci.* 1:82-89
- Kranz, E. und Kumlehn, J.** (1999) Angiosperm fertilisation, embryo and endosperm development *in vitro*. *Plant Science* 142:183-197
- Kranz, E., Bautor, J., Lörz, H.** (1991). *In vitro* fertilization of single, isolated gametes of maize mediated by electrofusion. *Sexual Plant Reproduction* 4, 12-16.
- Kranz, E., Von Wiegen, P., Quader, H., Lörz, H.** (1998). Endosperm development after fusion of isolated, single maize sperm and central cells *in vitro*. *Plant Cell* 10, 511-524.
- Kumar, A. und Bennetzen, J. L.** (1999) Plant retrotransposons. *Annu. Rev. Genet.* 33:479-532
- Lai, J., Dey, N., Kim, C. S., Bharti, A. K., Rudd, S., Mayer, K. F. X., Larkins, B. A., Becraft, P., Messing, J.** (2004) Charakterization of the Maize Endosperm Transcriptome and Its Comparison to the Rice Genome. *Genome Res.* 14:1932-1937
- Lauria, M., Rupe, M., Guo, M., Kranz, E., Viotti, A., Lund, G.** (2004) Extensive maternal DNA hypomethylation in maize endosperm. *Plant Cell* 16, 510-522.
- Laux, T. und Jürgens, G.** (1997) Embryogenesis: A New Start in Life. *Plant Cell* 9:989-1000
- Le, Q., Gutiérrez-Marcos, J. F., Costa, L. M., Meyer, S., Dickinson, H. G., Lörz, H., Kranz, E., Scholten S.** (2005). Construction and screening of subtracted cDNA libraries from limited populations of plant cells: a comparative analysis of gene expression between maize egg cells and central cells. *Plant J.* 44, 167-178
- Li, C. et al.** (2006) An ARGONAUTE4-containing nuclear processing center colocalize with Cajal bodies in *Arabidopsis thaliana*. *Cell* 126:93-106

- Li, Z.-K., Luo, L. J., Mei, H. W., Wang, D. L., Shu, Q. Y., Tabien, R., Zhong, D. B., Ying, C. S., Stansel, J. W., Khush, G. S. and Paterson, A. H.** (2001) Overdominant epistatic loci are the primary basis of inbreeding depression and heterosis in rice. I. Biomass and Grain yield. *Genetics* 158: 1737-1753.
- Lindsey, K. und Topping, J.E.** (1993) Embryogenesis: a question of pattern. *J. Exp. Bot.* 259:359-374
- Lippman, Z., Gendrel, A. V., Black, M., Vaughn, M. W., Dedhia, N., McCombie, W. R., Lavine, K., Mittal, V., May, B., Kasschau, K. D.** (2004) Role of transposable elements in heterochromatin and epigenetic control. *Nature* 430:471-476
- Lippman, Z., May, B., Yordan, C., Singer, T., Martienssen, R.** (2003) Distinct mechanism determine transposon inheritance and methylation via small interfering RNA and histone modification. *PLoS Biol.* 1:e67
- Lopes, M. A. und Larkins, B. A.** (1993) Endosperm origin, development, and function. *Plant Cell* 5:1383-1399
- Luo, L. J., Li, Z. K., Mei, H. W., Shu, Q. Y., Tabien, R., Zhong, D. B., Ying, C. S., Stansel, J. W., Khush, G. S., Paterson, A. H.** (2001) Overdominant epistatic loci are the primary genetic basis of inbreeding depression and heterosis in rice. II. Gain yield components. *Genetics* 158:1755-1771
- Mansfield, S. G. und Briarty, L. G.** (1990) Early embryogenesis in *Arabidopsis thaliana*. II. The developing embryo. *Can. J. Bot.* 69:461-467
- Marillonet, S. und Wessler, S. R.** (1998) Extreme structural heterogeneity among the members of maize retrotransposon family. *Genetics* 150(3):1245-1256
- Martienssen, R. A. und Colot, V.** (2001) DNA methylation and epigenetic inheritance in plants and filamentous fungi. *Science* 293:1070
- Matsumoto, K., Anzai, M., Nakagata, N., Takahashi, A., Takahashi, Y., Miyata, K.** (1994) Onset of paternal gene activation in early mouse embryos fertilized with transgenic mouse sperm. *Mol. Reprod. Dev.* 39:136-140
- Meyer RC, Torjek O, Becher M, Altmann T** (2004) Heterosis of biomass production in Arabidopsis. Establishment during early development. *Plant Physiol* 134:1813-23
- Meyer, S., Pospisil, H., Scholten, S.** (2007) Heterosis associated gene expression in maize embryo six days after fertilization exhibits additive, dominant and overdominant pattern. *Plant Mol Biol* 63:381-391
- Meyers, B. C., Tingey, S. V., Morgante, M.** (2001) Abundance, distribution, and transcriptional activity of repetitive elements in the maize genome. *Genome Res.* 11(10):1660-1676
- Michalak, P. und Noor, M. A. F.** (2003) Genome-wide patterns of expression in *Drosophila* pure species and hybrid males. *Mol. Biol. Evol.* 20:1070-1076
- Moll, R. H., Lindsey, M. F., Robinson, H. F.** (1964) Estimates of genetic variances and level of dominance in maize. *Genetics* 49:411-423
- Murdoch, H. A.** (1940) Hybrid vigor in maize embryos. *J Hered* 31:361-363
- Nan, X., Ng, H. H., Johnson, C. A., Laherty, C. D., Turner, B. M., Eisenman, R. N., Bird, A.** (1998) Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature* 393:386-389
- Ni, Z., Sun, Q., Liu, Z., Wu, L., Wang, X.** (2000) Identification of a hybrid-specific expressed gene encoding novel RNA-binding protein in wheat seedlings leaves using differential display. *Mol. Gen. Genet.* 263: 934-938.
- Nickerson, N. H.** (1959) Sustained treatment with gibberellic acid of five different kinds of maize. *Ann Missouri Bot Garden* 46:19-37
- Nothias, J.-Y., Miranda, M., DePamphilis, M.L.** (1996) Uncoupling of transcription and translation during zygotic gene activation in the mouse. *EMBO J.* 15, 5715-5725
- Ohad, N., Margossian, L., Hsu, Y. C., Williams, C., Repetti, P., Fischer, R. L.** (1996) A mutation that allows endosperm development without fertilization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:5319-5324

- Okamoto, T., Scholten, S., Lörz, H., Kranz, E.** (2005) Identification of Genes that are Up- or Down-regulated in the Apical or Basal Cell of Maize Two-celled Embryos and Monitoring their Expression During Zygote Development by a Cell Manipulation- and PCR-based Approach. *Plant Cell Physiol.* 46(2):332-338
- Olsen, O. A.** (1998) Endosperm developments. *Plant Cell* 10:485-488
- Olsen, O. A.** (2001) Endosperm development: Cellularization and cell fate specification. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52: 233-267.
- Olsen, O. A., Potter, R. H., Kalla, R.** (1992) Histo-differentiation and molecular biology of developing cereal endosperm. *Seed Sci. Res.* 2:117-131
- Olsen, O.A.** (2004) Nuclear endosperm development in cereals and *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 16, S214-227
- Onodera, Y., et al.** (2005) Plant nuclear RNA polymerase IV mediates siRNA and DNA methylation-dependent heterochromatin formation. *Cell* 120:613-622
- Opsahl-Ferstad, H. G., Le Deunff, E., Dumas, C., Rogowsky, P.M.** (1997) ZmEsr, a novel endosperm-specific gene expressed in a restricted region around the maize embryo. *Plant J.* 12:235-246
- Osborn, T. C., Pires, J. C., Birchler, J. A., Auger D. L., Chen, Z. J., Lee, H. S., Comai, L., Madlung, A., Doerge, R. W., Colet, V., Martienssen, R. A.** (2003) Understanding mechanisms of novel gene expression in polyploids. *Trends Genet.* 19:141-147
- Owen-Hughes, T.** (2003) Pathways for remodelling chromatin. *Biochemical Society Transactions* 31:893-905
- Ozturk, Z. N., Talamé, V., Deyholos, M., Michalowski, C. B., Galbraith, D. W., Gozukirmizi, N., Tuberosa, R. and Bohnert, H. J.** (2002) Monitoring large-scale changes in transcript abundance in drought- and salt-stressed barley. *Plant Mol. Biol.* 48: 551-573.
- Paleg, L. G.** (1965) Physiological effect of gibberellins. *Annu Rev Plant Physiol* 16:291-322
- Palladino, F. et al.** (1993) SIR3 and SIR4 proteins are required for the positioning and integrity of yeast telomeres. *Cell* 75:543-555
- Pang, S. Z., DeBoer, D. L., Wan, Y., Ye, G., Layton, J. G., Neher, M. K., Armstrong, C. L., Fry, J. E., Hinchey MAW., Fromm, M. E.** (1996) An Improved Green Fluorescent Protein Gene as a Vital Marker in Plants. *Plant Physiol.* 112(3):893-900
- Peng, J., Richards, D. E., Hartley, N. M., Murphy, G. P., Devos, K. M., Flintham, J. E., Beales, J., Fish, L. J., Worland, A. J., Pelica, F., Sudhakar, D., Cristou, P., Snape, J. W., Gale, M. D., Hardberd, N. P.** (1999) 'Green revolution' genes encode mutant gibberellin response modulators. *Nature* 400(6741):256-261
- Pipal, A., Goralik-Schramel, M., Lusser, A., Lanzanova, C., Sarg, B., Loidl, A., Lindner, H., Rossi, V., Loidl, P.** (2003) Regulation and Processing of maize histone deacetylase Hda1 by limited proteolysis. *Plant Cell.* 15(8):1904-1917
- Poethig, R. S., Coe, E. H., Johri, M. M.** (1986) Cell lineage patterns in maize embryogenesis: a clonal analysis. *Developmental Biology* 117:392-404
- Prendergast, G. C. und Ziff, E. B.** (1991) Methylation-sensitive sequence-specific DNA binding by Myc basic region. *Science* 251:186-189
- R Development Core Team** (2005). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>
- Randolph, L. F.** (1936) Developmental morphology of the caryopsis in maize. *J. Agric. Res.* 53:881-916
- Ranz, J. M., Namgyal, K., Gibson, G., Hartl, D. L.** (2004) Anomalies in the expression profile of interspecific hybrids of *Drosophila melanogaster* and *D. simulans*. *Genome Res.* 14:373-379
- Reik, W. und Walter, J.** (2001) Genomic imprinting: parental influences on the genome. *Nat. Rev. Genet.* 2:21-32
- Reyes, J. C.** (2006) Chromatin modifiers that control plant development. *Curr. Opin. Plant Biol.* 9:21-27

- Reyes, J. C., Henning, L., Gruissem, W.** (2002) Chromatin-remodeling and memory factors. New regulators of plant development. *Plant Physiol.* 130:1090-1101
- Rho, J., Altmann, C. R., Socci, N. D., Merkov, L., Kim, N., So, H., Lee, O., Takami, M., Brivanlou, A. H., Choi, Y.** (2002) Gene expression profiling of osteoclast differentiation by combined suppression subtractive hybridization (SSH) and cDNA microarray analysis. *DNA Cell Biol.* 21: 541-549.
- Rood, S. B., Blake, R. I., Pharis, R. P.** (1983) Gibberellins and heterosis in maize, II. Response to gibberellic acid and metabolism of [<sup>3</sup>H]gibberellin A<sub>20</sub>. *Plant Physiol* 71:645-651
- Rood, S. B., Buzzell, R. I., Major, D. J., Pharis, R. P.** (1990) Gibberellins and heterosis in maize: quantitative relationships. *Crop Sci* 30:281-286
- Rood, S. B., Buzzell, R. I., Mander, L. N., Pearce, D., Pharis, R. P.** (1988) A phytohormonal basis for heterosis in maize. *Science* 241:1216-1218
- Rood, S. B., Buzzell, R. I., Mander, L. N., Pearce, D., Pharis, R. P.** (1998) Gibberellins: A Phytohormonal Basis for Heterosis in Maize. *Science* 241:1216-1218
- Rudd S, Mewes HW, Mayer KF** (2003) Sputnik: a database platform for comparative plant genomics. *Nucleic Acids Res.* 31:128-32
- Russel, S. D.** (1992) Double fertilization. *Int. Rev. Cytol.* 140:357-390
- Russel, S. D.** (1993) The Egg Cell: Development and Role in Fertilization and Early Embryogenesis. *Plant Cell* 5:1349-1359
- Russell, W. A.** (1974) Comparative performance for maize hybrids representing different eras of maize breeding. *Proc. 29<sup>th</sup> Annu. Corn Sorghum Res. Conf.*, pp. 81-101
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T.** (1989). Molecular Cloning - A Laboratory Manual, 2<sup>nd</sup> Edition. *Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York.*
- SanMiguel, P. und Bennetzen, J. L.** (1998) Evidence that a recent increase in maize genome size was caused by the massive amplification of intergene retrotransposons. *Ann. Bot.* 82:37-44
- SanMiguel, P., Tikhonov, A., Jin, Y. K., Motchoulskaia, N., Zakharov, D.** (1996) Nested retrotransposons in the intergenic regions of the maize genome. *Science* 274:765-768
- Sanz-Alferez, S., SanMiguel, P., Jin, Y. K., Springer, P. S., Bennetzen, J. L.** (2003) Structure and evolution of Cinfu retrotransposon family of maize. *Genome* 46(5):745-752
- Sarkissian, I. V., Kessinger, M. A., Harris, W.** (1964) Differential rates of development of heterotic and nonheterotic young maize seedlings, I. Correlation of differential morphological development with physiological differences in germinating seeds. *Proc Natl Acad Sci USA* 51:212-218
- Sawicki, J.A., Magnuson, T. & Epstein, C.J.** Evidence for expression of the paternal genome in the two-celled mouse embryo. *Nature* 294, 450-451(1981).
- Schadt, E. E., Monks, S. A., Drake, T. A., Lusk, A. J., Che, N.** (2003) Genetics of gene expression surveyed in maize, mouse and man. *Nature* 422:297-302
- Schenk, P. M., Kazan, K., Manners, J.M., Anderson, J. P., Simpson, R. S., Wilson, I. W., Somerville, S. C., Maclean, D. J** (2003) Systemic Gene Expression in *Arabidopsis* during an Incompatible Interaction with *Alternaria brassicicola*. *Plant Physiol.* 132:99-1010
- Schmittgen, T. und Zakrajsek, B. A.** (2000) Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR. *J Biochem Biophys Methods* 46:69-81
- Scholten, S. and Kranz, E.** (2001) In vitro fertilization and expression of transgenes in gametes and zygotes. *Sex Plant Reprod.* 14: 35-40.
-

- Scholten, S., Lörz, H., Kranz, E.** (2002) Paternal mRNA and protein synthesis coincides with male chromatin decondensation in maize zygotes. *Plant J.* 32:221-231
- Semel, Y., Nissenbaum, J., Menda, N., Zinder, M., Krieger, U., Issman, N., Pleban, T., Lippman, Z., Gur, A., Zamir, D.** (2006) Overdominant quantitative trait loci for yield and fitness in tomato. *PNAS* 103(35):12981-12986
- Shafer, J.** (1944) The Relation of Embryo Axis Weights to Heterosis. *American Journal of Botany* 31(8):503-506
- Shull, G.H.** (1908) The composition of a field of maize. *Ann. Breed. Assoc.* 4: 296-301.
- Shull, G. F.** (1952) Beginnings of the heterosis concept. In: *Gowen JW (ed) Heterosis. Iowa State College Press, Ames*, pp 14-48
- Siebert, P. D., and Larrick, J. W.** Cloning and Analysis. Eds. (*BioTechniques Books, MA*) pp. 213-239.
- Sommer, H., Bonas, U., Saedler, H.** (1988) Transposon-induced alterations in the promoter region affect transcription of the chalcone synthase gene of *Antirrhinum majus*. *Mol Gen Genet.* 211(1):49-55
- Song, R., and Messing, J.** (2003) Gene expression of a gene family in maize based on noncollinear haplotypes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 9055-9060.
- Sprague, G. F.** (1936) Hybrid vigor and growth rates in a maize cross and its reciprocal. *J Agric. Res.* 53:819-830
- Sprague, G. F.** (1983) Heterosis in maize: theory and practice. *Monogr. Theor. Appl. Genet.* 6:47-70
- Sprague, G. F. und Russell, W. A.** (1956) Some evidence on type of gene action involved in yield heterosis in maize. *Proc. Int. Genet. Symp., Tokyo & Kyoto*, 522-526
- Springer, N. M. und Stupar, R. M.** (2007) Allelic variation and heterosis in maize: How do two halves make more than a whole? By *Cold Spring Harbor Laboratory Press; ISSN 1088-9051/07*
- Sprunck S, Baumann U, Edwards K, Langridge P, Dresselhaus T** (2005) The transcript composition of egg cells changes significantly following fertilization in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant J* 41:660-672
- Stam, M., Belele, C., Dorweiler, J. E., Chandler, V. L.** (2002) Differential chromatin structure within a tandem array 100kb upstream of the maize b1 locus is associated with paramutation. *Genes & Dev.* 16:1906-1918
- Strahl-Bolsinger, S. et al.** (1997) SIR2 and SIR4 interactions differ in core and extended telomeric heterochromatin in yeast. *Genes Dev.* 11:83-93
- Stuber, C. W., Lincoln, S. E., Wolff, D. W., Helentjaris, T and Lander, E. S.** (1992) Identification of genetic factors contributing to heterosis in a hybrid from two elite maize inbred lines using molecular markers. *Genetics* 132: 832-838.
- Stupar, R. M. und Springer, N.M.** (2006) *Cis*-transcriptional Variation in Maize Inbred Lines B73 and Mo17 Leads to Additive Expression Patterns in the F<sub>1</sub> Hybrid. *Genetics* 173:2199-2210
- Sun, Q. X., Ni, Z. F., Lui, Z. Y.** (1999) Differential gene expression between wheat hybrids and their parental inbreds in seedling leaves. *Euphytica* 106:11-17, 123
- Sun, Q. X., Wu, L. M., Ni, Z. F., Meng, F. R., Wang, Z. K., Lin, Z.** (2004) Differential gene expression patterns in leaves between hybrids and their parental inbreds are correlated with heterosis in a wheat diallel cross. *Plant Sci.* 166:651-657
- Swanson-Wagner R. A., Jia Y., DeCook R., Borsuk L. A., Nettleton D., Schnable P. S.** (2006) All possible modes of gene action are observed in a global comparison of gene expression in a maize F<sub>1</sub> hybrid and its inbred parents *PNAS* 103: 6805-6810
- Tenaillon, M. I., Sawkins, M. C., Long, A. D., Gaut, R. L., Doebley, J. F.** (2001) Patterns of DNA sequence polymorphisms along chromosome 1 of maize (*Zea mays* ssp. *mays* L.). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:9161-9166
- Tran, R. K., Zilberman, D., de Bustos, C., Ditt, R. F., Henikoff, J. G., Lindroth, A. M., Delrow, J., Boyle, T., Kwong, S., Bryson, T. D., Jacobsen, S. E., Henikoff, S.** (2005) Chromatin and siRNA pathways cooperate to maintain DNA methylation of small transposable elements in *Arabidopsis*. *Genome Biology* 6:R90

- Turcich, M. P. und Mascarenhas, J. P.** (1994) PREM-1, a putative maize retroelement has LTR (long terminal repeat) sequences that are preferentially transcribed in pollen. *Sex. Plant Reprod.* 7:2-11
- Turcich, M. P., Bokhari-Riza, A., Hamilton, D. A., He, C., Messier, W., Stewart, C. B., Mascarenhas, J. P.** (1996) PREM-2, a copia-type retroelement in maize is expressed preferentially in early microspores. *Sex. Plant Reprod.* 9:65-74
- Uzarowska, A., Keller, B., Piepho, H. P., Schwarz, G., Ingvarsdson, C., Wenzel, G., Lübberstedt, T.** (2007) Comparative expression profiling in meristems of inbred-hybrid triplets of maize based on morphological investigations of heterosis for plant height. *Plant Mol. Biol.* 63:21-34
- Van Hengel, A. J., Guzzo, F., van Kammen, A., de Vries S. C.** (1998) Expression pattern of the carrot EP3 endochitinase genes in suspension cultures and in developing seeds. *Plant Phys.* 117:43-53
- Van Lammerern, A. A. M.** (1986) Developmental morphology and cytology of the young maize embryo (*Zea mays* L.). *Acta. Bot. Neerl.* 35(3):169-188
- Vielle-Calzada, J. P., Baskar, R., Grossniklaus, U.** (2001) Early paternal gene activity in *Arabidopsis*. *Nature* 414:710.
- Vielle-Calzada, J.-P., Baskar, R. und Grossniklaus, U.** Delayed activation of the paternal genome during seed development. *Nature* 404, 91-94 (2000).
- Voiblet, C., Duplessis, S., Encelot, N., Martin, F.** (2001) Identification of symbiosis-regulated genes in *Eucalyptus globulus-Pisolithus tinctorius* ectomycorrhiza by differential hybridization of arrayed cDNAs. *Plant Journal* 25(2):181-191
- Vroh, B., McMullen, M. D., Sanchez-Villeda, H., Schroeder, S., Gardiner, J.** (2005) Single nucleotide polymorphisms and insertion-deletions for genetic markers and anchoring the maize fingerprint contig physical map. *Crop Sci* 46:12-21
- Vuylsteke M, van Eeuwijk F, Van Hummelen P, Kuiper M, Zabeau M** (2005) Genetic analysis of variation in gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* 171:1267-75
- Wagner, D.** (2003) Chromatin regulation of plant development. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6:20-28
- Walbot, V. & Evans, M.M.S.** (2003) Unique features of the plant life cycle and their consequences. *Nat. Rev. Genet.* 4, 369-379
- Wang F.H.** Embryological development of inbred and hybrid *Zea mays* L.. *Am. J. Bot.* 34, 113-125 (1947).
- Weijers, D., Geldner, N., Offringa, R. and Jürgens, G.** (2001) Early paternal gene activity in *Arabidopsis*. *Nature* **414**: 709-710.
- Welford, S. M., Gregg, J., Chen, E., Garrison, D., Soerensen, P. H., Denny, C. T., Nelson, S. F.** (1998) Detection of differentially expressed genes in primary tumor tissues using representational difference analysis coupled to microarray hybridization. *Nucleic Acids Res.* 26:3059-3065
- Wessler, S. R.** (2001) Plant Transposable Elements. A Hard Act to Follow. *Plant Physiology* 125:149-151
- Wittkopp, P. J.** (2005) Genomic sources of regulatory variation in *cis* and *trans*. *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.* 62:1779-1783
- Wittkopp, P. J., Haerum, B. K., Clark, A. G.** (2004) Evolutionary changes in *cis* and *trans* gene regulation. *Nature* 430:85-88
- Wu, L.M., Ni, Z.F., Meng, F. R., Lin, Z., Sun, Q. X.** (2003) Cloning and characterization of leaf cDNAs that are differentially expressed between wheat hybrids and their parents. *Mol. Gen. Genet.* 270:281-286
- Xiao, J. H., Li, J., Yuan, L. P. and Tanksley, S. D.** (1994) Dominance is the major genetic basis of heterosis in rice as revealed by QTL analysis using molecular markers. *Genetics* 140: 745-754.
- Xie, Z. et al.** (2004) Genetic and functional diversification of small RNA pathways in plants. *PLoS Biol.* 2:e104
- Yang, G. P., Ross, D. T., Kuang, W. W., Brown, P. O. and Weigel, R. J.** (1999) Combining SSH and cDNA microarrays for rapid identification of differentially expressed genes. *Nucleic Acids Res.* 27: 1517-1523.
-

- Yao, Y., Ni, Z., Zhang, Y., Chen, Y., Ding, Y., Han, Z., Liu, Z., Sun, Q.** (2005) Identification of differential expressed genes in leaf and root between wheat hybrid and its parental inbreds using PCR-based cDNA subtraction. *Plant Mol Biol* 58:367-384
- Yeung, E. C. und Meinke, D. W.** (1993) Embryogenesis in angiosperms: Development of the suspensor. *Plant Cell* 5:1371-1381
- Yu, S. B., Li, J. X., Xu, C. G., Tan, Y. F. and Guo, Y.J.** (1997) Importance of epistasis as the genetic basis of heterosis in an elite rice hybrid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 9226-9231.
- Zhang, X., Tamaru, H., Khan, S. I., Horton, J. R., Keefe, L. J., Selker, E. U., Cheng, X.** (2002) Structure of the Neurospora SET domain protein DIM-5, a histone H3 lysin methyltransferase. *Cell* 111(1):117-127
- Zheng, J., Zhao, J., Tao, Y.** (2004) Isolation and analysis of water stress induced genes in maize seedlings by subtractive PCR and microarray. *Plant Mol. Biol.* 55:807-823
- Zilberman, D. et al.** (2004) Role of *Arabidopsis* ARGONAUTE 4 in RNA-directed DNA methylation triggered by inverted repeats. *Curr. Biol.* 14:1214-1220
- Zilberman, D., Cao, X., Jacobsen, S. E.** (2003) ARGONAUTE 4 control of locus-specific siRNA accumulation and DNA and Histone methylation. *Science* 299:716-719

## 7 Anhang

### 7.1 Untersuchungen zur allelspezifischen Genexpression

**Tabelle 15: Expressionsniveau der allelspezifisch untersuchten Gene**

Datenbank- Nummer	Genotyp	qRT-PCR 6 dap Embryo mittlerer C <sub>t</sub> -Wert	qRT-PCR 6 dap Embryo Standardabweichung des Ct-Wertes	qRT-PCR 6 dap Embryo log <sub>2</sub> mittlere Ratio 005:301
EH038207	301x301	44,28	3,55	19,49
	005x005	23,89	1,03	
EH038206	301x301	28,14	1,48	5,91
	005x005	21,83	0,51	
EH038219	301x301	36,66	2,40	5,26
	005x005	30,84	0,36	
EH038208	301x301	23,69	1,01	4,96
	005x005	18,43	0,58	
DW475393	301x301	30,78	1,69	3,77
	005x005	26,69	0,67	
EH038220	301x301	27,42	1,58	2,56
	005x005	24,70	0,75	
EH038205	301x301	27,15	0,82	2,10
	005x005	24,85	0,43	
EH038221	301x301	26,84	2,90	1,80
	005x005	24,83	0,46	
EH038213	301x301	26,13	1,39	1,71
	005x005	24,32	1,00	
EH038212	301x301	28,43	1,17	1,20
	005x005	27,15	1,95	
EH038216	301x301	28,81	1,11	1,06
	005x005	27,65	1,00	
AB194864	301x301	23,17	1,86	0,88
	005x005	22,23	1,32	
EH038218	301x301	23,41	1,34	0,77
	005x005	22,62	0,98	
EH038214	301x301	n. d.	n. d.	n. d.
	005x005	28,04	0,97	
EH038209	301x301	27,09	1,56	0,12
	005x005	26,96	1,26	
EH038210	301x301	22,11	0,37	0,08
	005x005	22,02	1,22	
DW475554	301x301	20,46	1,28	0,93
	005x005	21,47	1,68	
EH038215	301x301	22,58	0,88	1,47
	005x005	24,10	1,26	
EH038217	301x301	25,53	0,20	2,23
	005x005	27,93	0,14	
EH038211	301x301	21,77	0,71	5,40
	005x005	27,17	0,90	

20 Gene wurden auf Grund der verschieden starken Genexpressionsunterschiede in sechs dap Embryonen der Inzuchtlinien UH301 und UH005 ausgewählt. Die Tabelle gibt einen Überblick über den durchschnittlichen Ct-Wert von drei unabhängig von einander, mit dreifach Wiederholung der Proben durchgeführten qRT-PCR Untersuchungen, der Standardabweichung der Ct-Werte sowie der durchschnittlichen log<sub>2</sub> Ratio (005/301).

**Tabelle 16: Übersicht über monoallelische Detektionsgrenzen und Datennormalisierung**

Datenbank- Nummer	Normalisierungs- faktor: Allele 005	Obere Detektionsgrenze Allele 005	Untere Detektionsgrenze Allele 005	Normalisierungs- faktor: Allele 301	Obere Detektionsgrenze Allele 301	Untere Detektionsgrenze Allele 301
EH038207	0,0000	0,951	0,114	0,0000	0,886	0,049
EH038206	0,6370	1,000	0,000	2,2360	1,000	0,000
EH038219	0,9800	0,859	0,194	1,0200	0,806	0,141
EH038208	0,7385	0,754	0,000	1,5432	1,000	0,246
DW475393	1,0204	0,943	0,000	0,9803	1,000	0,057
EH038220	1,0890	0,872	0,000	0,9240	1,000	0,128
EH038205	0,8757	1,000	0,000	1,1655	1,000	0,000
EH038221	1,0660	1,000	0,240	0,9416	0,760	0,000
EH038213	0,0000	0,919*	0,000*	0,0000	1,000*	0,081*
EH038212	0,8200	1,000	0,135	1,2820	0,865	0,000
EH038216	0,0000	0,935	0,000	0,0000	1,000	0,065
AB194864	0,0000	0,901	0,000	0,0000	1,000	0,099
EH038218	0,0000	0,946	0,000	0,0000	1,000	0,054
EH038214	1,0373	1,000	0,086	0,9652	0,914	0,000
EH038209	1,2220	0,927	0,000	0,8460	1,000	0,073
EH038210	1,0800	0,680	0,236	0,9310	0,764	0,320
DW475554	0,9615	0,714	0,269	1,0410	0,731	0,286
EH038215	0,8760	0,969	0,065	1,1650	0,935	0,031
EH038217	0,0000	0,900	0,000	0,0000	1,000	0,100
EH038211	0,9823	1,000	0,082	1,0160	0,918	0,000

Die Faktoren, die mit Hilfe der gDNA-Werte des Hybrid 301x005 errechnet und für die Datennormalisierung genutzt wurden, sowie die Detektionsgrenzen für monoallelische Expression, die mittels gDNA der Inzuchtlinien UH301 und UH005 ermittelt wurden, sind für die allelspezifisch untersuchten Gene gegeben.

Tabelle 17: Parentale Genomaktivitäten in den frühen Stadien der Embryogenese

Datenbank- Nummer	Gewebe	Genotyp	Anzahl der Einzelanalysen	norm. Mittelwert Allel 005	norm. Mittelwert Allel 301	Standard- abweichung
EH038207	1 dap EMB	005x301	12	0,99	0,01	0,018
	1 dap EMB	301x005	12	0,95	0,05	0,055
	3 dap EMB	005x301	12	0,99	0,01	0,024
	3 dap EMB	301x005	12	1,00	0,00	0,014
	6 dap EMB	005x301	12	0,98	0,02	0,038
	6 dap EMB	301x005	12	0,99	0,01	0,025
	8 dap EMB	005x301	12	0,98	0,02	0,072
	8 dap EMB	301x005	12	1,00	0,00	0,000
EH038206	1 dap EMB	005x301	12	1,00	0,00	0,000
	1 dap EMB	301x005	11	1,00	0,00	0,000
	3 dap EMB	005x301	12	1,00	0,00	0,000
	3 dap EMB	301x005	12	1,00	0,00	0,000
	6 dap EMB	005x301	12	0,99	0,01	0,019
	6 dap EMB	301x005	12	1,00	0,00	0,000
	8 dap EMB	005x301	12	0,56	0,44	0,073
	8 dap EMB	301x005	12	0,60	0,40	0,031
	14 dap EMB	005x301	12	0,61	0,39	0,041
	14 dap EMB	301x005	12	0,54	0,46	0,037
EH038219	1 dap EMB	005x301	12	0,86	0,14	0,027
	1 dap EMB	301x005	12	0,87	0,13	0,022
	3 dap EMB	005x301	12	0,83	0,17	0,058
	3 dap EMB	301x005	12	0,85	0,15	0,039
	6 dap EMB	005x301	12	0,83	0,17	0,033
	6 dap EMB	301x005	12	0,77	0,23	0,010
	8 dap EMB	005x301	10	0,82	0,18	0,037
	8 dap EMB	301x005	11	0,82	0,18	0,019
EH038208	1 dap EMB	005x301	12	0,60	0,40	0,020
	1 dap EMB	301x005	11	0,52	0,48	0,069
	3 dap EMB	005x301	12	0,54	0,46	0,014
	3 dap EMB	301x005	12	0,62	0,38	0,102
	6 dap EMB	005x301	12	0,49	0,51	0,032
	6 dap EMB	301x005	12	0,51	0,49	0,017
	8 dap EMB	005x301	12	0,51	0,49	0,010
	8 dap EMB	301x005	12	0,54	0,46	0,011
DW475393	1 dap EMB	005x301	12	0,93	0,07	0,007
	1 dap EMB	301x005	11	0,92	0,08	0,008
	3 dap EMB	005x301	12	0,87	0,13	0,078
	3 dap EMB	301x005	12	0,94	0,06	0,020
	6 dap EMB	005x301	12	0,92	0,08	0,006
	6 dap EMB	301x005	12	0,92	0,08	0,010
	8 dap EMB	005x301	12	0,92	0,08	0,008
	8 dap EMB	301x005	12	0,91	0,09	0,006
	14 dap EMB	005x301	12	0,92	0,08	0,014
	14 dap EMB	301x005	12	0,92	0,08	0,006
EH038220	1 dap EMB	005x301	11	0,41	0,59	0,041
	1 dap EMB	301x005	12	0,37	0,63	0,046
	3 dap EMB	005x301	12	0,41	0,59	0,024
	3 dap EMB	301x005	11	0,39	0,61	0,031
	6 dap EMB	005x301	12	0,38	0,62	0,044
	6 dap EMB	301x005	12	0,39	0,61	0,019
	8 dap EMB	005x301	11	0,41	0,59	0,020
	8 dap EMB	301x005	12	0,40	0,60	0,016
EH038205	1 dap EMB	005x301	12	0,87	0,13	0,024
	1 dap EMB	301x005	11	0,51	0,49	0,093
	3 dap EMB	005x301	12	0,76	0,24	0,065
	3 dap EMB	301x005	12	0,72	0,28	0,098
	6 dap EMB	005x301	12	0,57	0,43	0,009
	6 dap EMB	301x005	11	0,57	0,43	0,016
	8 dap EMB	005x301	12	0,60	0,40	0,009
	8 dap EMB	301x005	11	0,64	0,36	0,043

Fortsetzung der Tabelle 17

Datenbank- Nummer	Gewebe	Genotyp	Anzahl der Einzelanalysen	norm. Mittelwert Allel 005	norm. Mittelwert Allel 301	Standard- abweichung	
EH038221	1 dap EMB	005x301	12	0,49	0,51	0,013	
	1 dap EMB	301x005	12	0,52	0,48	0,014	
	3 dap EMB	005x301	12	0,48	0,52	0,026	
	3 dap EMB	301x005	12	0,49	0,51	0,036	
	6 dap EMB	005x301	12	0,48	0,52	0,008	
	6 dap EMB	301x005	12	0,49	0,51	0,012	
	8 dap EMB	005x301	12	0,48	0,52	0,014	
	8 dap EMB	301x005	12	0,47	0,53	0,018	
EH038213	1 dap EMB	005x301	12	0,47	0,53	0,017	
	1 dap EMB	301x005	12	0,34	0,66	0,015	
	3 dap EMB	005x301	12	0,48	0,52	0,031	
	3 dap EMB	301x005	12	0,53	0,47	0,146	
	6 dap EMB	005x301	12	0,43	0,57	0,029	
	6 dap EMB	301x005	12	0,43	0,57	0,025	
	8 dap EMB	005x301	12	0,44	0,56	0,015	
	8 dap EMB	301x005	12	0,45	0,55	0,018	
EH038212	1 dap EMB	005x301	12	0,46	0,54	0,056	
	1 dap EMB	301x005	12	0,10	0,90	0,033	
	3 dap EMB	005x301	12	0,52	0,48	0,183	
	3 dap EMB	301x005	9	0,65	0,35	0,371	
	6 dap EMB	005x301	12	0,54	0,46	0,018	
	6 dap EMB	301x005	11	0,53	0,47	0,036	
	8 dap EMB	005x301	10	0,54	0,46	0,017	
	8 dap EMB	301x005	11	0,54	0,46	0,013	
EH038216	1 dap EMB	005x301	12	0,77	0,23	0,111	
	1 dap EMB	301x005	12	0,44	0,56	0,391	
	3 dap EMB	005x301	12	0,47	0,53	0,197	
	3 dap EMB	301x005	9	0,73	0,27	0,038	
	6 dap EMB	005x301	12	0,51	0,49	0,019	
	6 dap EMB	301x005	12	0,57	0,43	0,013	
	8 dap EMB	005x301	12	0,51	0,49	0,013	
	8 dap EMB	301x005	12	0,51	0,49	0,011	
	14 dap EMB	005x301	12	0,50	0,50	0,015	
	14 dap EMB	301x005	12	0,51	0,49	0,014	
	AB194864	1 dap EMB	005x301	11	0,28	0,72	0,111
		1 dap EMB	301x005	12	0,36	0,64	0,065
		3 dap EMB	005x301	12	0,43	0,57	0,116
		3 dap EMB	301x005	11	0,56	0,44	0,239
6 dap EMB		005x301	12	0,43	0,57	0,057	
6 dap EMB		301x005	12	0,44	0,56	0,021	
8 dap EMB		005x301	11	0,46	0,54	0,057	
8 dap EMB		301x005	12	0,52	0,48	0,018	
EH038218	1 dap EMB	005x301	12	0,63	0,37	0,035	
	1 dap EMB	301x005	12	0,29	0,71	0,042	
	3 dap EMB	005x301	11	0,54	0,46	0,071	
	3 dap EMB	301x005	12	0,43	0,57	0,050	
	6 dap EMB	005x301	11	0,47	0,53	0,021	
	6 dap EMB	301x005	12	0,47	0,53	0,010	
	8 dap EMB	005x301	12	0,50	0,50	0,012	
	8 dap EMB	301x005	12	0,49	0,51	0,014	
	14 dap EMB	005x301	12	0,49	0,51	0,008	
	14 dap EMB	301x005	12	0,48	0,52	0,011	
	EH038214	1 dap EMB	005x301	12	0,69	0,31	0,231
		1 dap EMB	301x005	12	0,59	0,41	0,123
		3 dap EMB	005x301	12	0,54	0,46	0,045
		3 dap EMB	301x005	9	0,65	0,35	0,138
6 dap EMB		005x301	12	0,58	0,42	0,073	
6 dap EMB		301x005	12	0,56	0,44	0,015	
8 dap EMB		005x301	12	0,58	0,42	0,016	
8 dap EMB		301x005	12	0,55	0,45	0,012	

Fortsetzung der Tabelle 17

Datenbank- Nummer	Gewebe	Genotyp	Anzahl der Einzelanalysen	norm. Mittelwert Allel 005	norm. Mittelwert Allel 301	Standard- abweichung
EH038209	1 dap EMB	005x301	12	0,51	0,49	0,061
	1 dap EMB	301x005	12	0,36	0,64	0,072
	3 dap EMB	005x301	12	0,50	0,50	0,095
	3 dap EMB	301x005	12	0,32	0,68	0,075
	6 dap EMB	005x301	12	0,46	0,54	0,012
	6 dap EMB	301x005	12	0,42	0,58	0,025
	8 dap EMB	005x301	12	0,42	0,58	0,009
	8 dap EMB	301x005	12	0,42	0,58	0,008
EH038210	1 dap EMB	005x301	11	0,44	0,56	0,064
	1 dap EMB	301x005	12	0,32	0,68	0,036
	3 dap EMB	005x301	12	0,45	0,55	0,065
	3 dap EMB	301x005	12	0,24	0,76	0,090
	6 dap EMB	005x301	12	0,36	0,64	0,010
	6 dap EMB	301x005	12	0,34	0,66	0,013
	8 dap EMB	005x301	12	0,31	0,69	0,012
	8 dap EMB	301x005	12	0,32	0,68	0,008
DW475554	1 dap EMB	005x301	12	0,53	0,47	0,004
	1 dap EMB	301x005	12	0,43	0,57	0,098
	3 dap EMB	005x301	12	0,55	0,45	0,024
	3 dap EMB	301x005	11	0,51	0,49	0,022
	6 dap EMB	005x301	12	0,51	0,49	0,026
	6 dap EMB	301x005	11	0,51	0,49	0,009
	8 dap EMB	005x301	12	0,53	0,47	0,016
	8 dap EMB	301x005	12	0,53	0,47	0,009
EH038215	1 dap EMB	005x301	12	0,51	0,49	0,014
	1 dap EMB	301x005	12	0,37	0,63	0,059
	3 dap EMB	005x301	12	0,61	0,39	0,044
	3 dap EMB	301x005	12	0,40	0,60	0,074
	6 dap EMB	005x301	12	0,51	0,49	0,015
	6 dap EMB	301x005	12	0,47	0,53	0,015
	8 dap EMB	005x301	12	0,54	0,46	0,011
	8 dap EMB	301x005	12	0,53	0,47	0,013
EH038217	1 dap EMB	005x301	12	0,03	0,97	0,027
	1 dap EMB	301x005	12	0,05	0,95	0,075
	3 dap EMB	005x301	12	0,18	0,82	0,055
	3 dap EMB	301x005	12	0,00	1,00	0,000
	6 dap EMB	005x301	12	0,05	0,95	0,027
	6 dap EMB	301x005	12	0,12	0,88	0,016
	8 dap EMB	005x301	12	0,08	0,92	0,013
	8 dap EMB	301x005	12	0,07	0,93	0,013
EH038211	1 dap EMB	005x301	11	0,40	0,60	0,166
	1 dap EMB	301x005	12	0,20	0,80	0,085
	3 dap EMB	005x301	12	0,36	0,64	0,010
	3 dap EMB	301x005	12	0,18	0,82	0,055
	6 dap EMB	005x301	12	0,29	0,71	0,017
	6 dap EMB	301x005	12	0,31	0,69	0,020
	8 dap EMB	005x301	12	0,37	0,63	0,019
	8 dap EMB	301x005	12	0,36	0,64	0,006

Übersicht über die normalisierten relativen Expressionsniveaus der Allele 301 und 005 der 20 allelspezifisch untersuchten Gene; Angegeben ist die Anzahl der unabhängigen Messungen, der Mittelwert für das Allel 005, der Mittelwert für das Allel 301 sowie die Standardabweichung der Mittelwerte.

Tabelle 18: Genregulation in sechs und acht dap Hybridembryonen

Datenbank-Nr.	6 dap Embryo		8 dap Embryo		Eltern	
	301x005	005x301	301x005	005x301	6 dap	8 dap
AB194864	<i>cis/trans</i>	<i>cis/trans</i>	<i>trans</i>	<i>trans</i>		
EH038212	<i>cis/trans</i>	<i>cis/trans</i>	<i>cis/trans</i>	<i>cis/trans</i>		
EH038220	<i>cis/trans</i>	<i>cis/trans</i>	<i>cis</i>	<i>cis</i>		
EH038215	<i>cis/trans</i>	<i>cis/trans</i>	<i>cis/trans</i>	<i>cis/trans</i>		
EH038219	<i>cis/trans</i>	<i>cis/trans</i>	<i>cis</i>	<i>cis</i>		
EH038209	<i>trans</i>	<i>cis/trans</i>	<i>cis</i>	<i>cis</i>		P1 = P2
EH038206	<i>cis</i>	<i>cis</i>	<i>cis/trans</i>	<i>cis/trans</i>		P1 = P2
EH038218	<i>cis/trans</i>	<i>cis/trans</i>	<i>cis</i>	<i>cis</i>		P1 = P2
EH038207	<i>cis</i>	<i>cis</i>	<i>cis</i>	<i>cis</i>		
DW475554	<i>cis/trans</i>	<i>trans</i>	<i>trans</i>	<i>trans</i>		
EH038214	<i>cis/trans</i>	<i>cis/trans</i>	<i>cis/trans</i>	<i>cis</i>		
DW475393	<i>cis</i>	<i>cis</i>	<i>cis/trans</i>	<i>cis</i>		
EH038208	<i>cis/trans</i>	<i>cis/trans</i>	<i>cis/trans</i>	<i>cis</i>		
EH038210	<i>cis/trans</i>	<i>cis/trans</i>	<i>cis/trans</i>	<i>cis/trans</i>	P1 = P2	
EH038211	<i>cis</i>	<i>cis</i>	<i>cis/trans</i>	<i>cis/trans</i>		
EH038221	<i>cis/trans</i>	<i>cis/trans</i>	<i>trans</i>	<i>cis/trans</i>		
EH038216	<i>cis/trans</i>	<i>trans</i>	<i>cis</i>	<i>cis</i>		P1 = P2
EH038217	<i>cis</i>	<i>cis/trans</i>	<i>cis</i>	<i>cis</i>		
EH038213	<i>cis/trans</i>	<i>cis/trans</i>	<i>cis</i>	<i>cis</i>		
EH038205	<i>cis/trans</i>	<i>cis/trans</i>	<i>cis</i>	<i>cis</i>		

Auf der Basis der allelspezifischen Untersuchungen mittels statistischer Analyse unter Verwendung von zweiseitigen studentischen T-Tests ermittelte Genregulation der 20 untersuchten Gene in sechs und acht dap F1-Embryonen sowie Vergleich der allelischen Expression in den Inzuchtlinien der interpool Kombination UH301/UH005; Nach Stupar und Springer, 2006: *Cis*:  $H_0$ :  $H=1:1$ Mischung; *trans*:  $H_0$ :  $H\neq 1:1$ Mischung  $\cap$   $H_0$ :  $H=gDNA$ ; *cis/trans*:  $H_0$ :  $H\neq 1:1$ Mischung  $\cap$   $H_0$ :  $H\neq gDNA$   $\cap$   $H-Ration\neq 1$   $\cap$   $H-Ration\neq P-Ratio$

## 7.2 Heterosis-3k-Array

Tabelle 19: Charakterisierte Komponenten des Heterosis-3k-Arrays

<i>actin<sup>a</sup></i>	<i>crp109</i>	<i>hda105</i>	<i>sdg105</i>
<i>ago101</i>	<i>dcl101</i>	<i>hda106</i>	<i>sdg106</i>
<i>ago103</i>	<i>dcl103</i>	<i>hda108</i>	<i>sdg107</i>
<i>ago104</i>	<i>dcl104</i>	<i>hda110</i>	<i>sdg108</i>
<i>ago108</i>	<i>dmt101</i>	<i>hda113</i>	<i>sdg109</i>
<i>ago110</i>	<i>dmt102</i>	<i>hda114</i>	<i>sdg111</i>
<i>ago111</i>	<i>dmt103</i>	<i>hda116</i>	<i>sdg116</i>
<i>ago113</i>	<i>dmt104</i>	<i>hda117</i>	<i>sdg117</i>
<i>ago116</i>	<i>dmt105</i>	<i>hdt102</i>	<i>sdg118</i>
<i>ago118</i>	<i>dmt105</i>	<i>hta107</i>	<i>sdg130</i>
<i>ago119</i>	<i>dmt106</i>	<i>hta112</i>	<i>sdg131</i>
<i>bet2</i>	<i>dwarf8<sup>c</sup></i>	<i>hta114</i>	<i>sdg135</i>
<i>brd101</i>	<i>fie1</i>	<i>hxa109</i>	<i>sdg137</i>
<i>brd102</i>	<i>fie2</i>	<i>mbd101</i>	<i>set103</i>
<i>brd103</i>	<i>gapdh<sup>a</sup></i>	<i>mbd105</i>	<i>set104</i>
<i>cenh3</i>	<i>gln4<sup>c</sup></i>	<i>mbd106</i>	<i>set106</i>
<i>Centa<sup>b</sup></i>	<i>got1<sup>c</sup></i>	<i>mbd108</i>	<i>set113</i>
<i>cha101</i>	<i>got2<sup>c</sup></i>	<i>mbd109</i>	<i>set115</i>
<i>cha101</i>	<i>got3<sup>c</sup></i>	<i>mbd111</i>	<i>set119</i>
<i>cha102</i>	<i>gta101</i>	<i>mbd113</i>	<i>set120</i>
<i>cha103</i>	<i>gta105</i>	<i>mbd114</i>	<i>set122</i>
<i>cha104</i>	<i>gta106</i>	<i>mbd116</i>	<i>set123</i>
<i>cha105</i>	<i>gta107</i>	<i>mbd119</i>	<i>set124</i>
<i>cha109</i>	<i>gtb101</i>	<i>mbd109</i>	<i>set125</i>
<i>cha110</i>	<i>gtc101</i>	<i>nfa101</i>	<i>set126</i>
<i>cha111</i>	<i>gtd101</i>	<i>nfa102</i>	<i>set129</i>
<i>cha112</i>	<i>gte101</i>	<i>nfa103</i>	<i>sga101</i>
<i>cha116</i>	<i>gte102</i>	<i>nfa104</i>	<i>sgb101</i>
<i>cha118</i>	<i>gtf101</i>	<i>nfc101</i>	<i>sgb102</i>
<i>cha119</i>	<i>gtf102</i>	<i>nfc102</i>	<i>sgb103</i>
<i>cha120</i>	<i>Gypsy<sup>b</sup></i>	<i>nfc103</i>	<i>sgf101</i>
<i>cha122</i>	<i>h2a</i>	<i>nfc104</i>	<i>smh102</i>
<i>cha124</i>	<i>h2b5</i>	<i>nfc108</i>	<i>smh103</i>
<i>cha125</i>	<i>hac101</i>	<i>nfd101</i>	<i>smh104</i>
<i>cha126</i>	<i>hac104</i>	<i>nfd102</i>	<i>smh106</i>
<i>cha127</i>	<i>hac105</i>	<i>nfd103</i>	<i>smh109</i>
<i>chb101</i>	<i>hac106</i>	<i>nfd104</i>	<i>spo41</i>
<i>chc101</i>	<i>hac108</i>	<i>nfd105</i>	<i>spp<sup>c</sup></i>
<i>chr101</i>	<i>hac109</i>	<i>nfd106</i>	<i>sps<sup>c</sup></i>
<i>chr102</i>	<i>hac110</i>	<i>nfd107</i>	<i>Stonor<sup>b</sup></i>
<i>chr106</i>	<i>hac111</i>	<i>nfd108</i>	<i>Tekay<sup>b</sup></i>
<i>chr111</i>	<i>hac112</i>	<i>nfd109</i>	<i>ubiquitin<sup>a</sup></i>
<i>chr113</i>	<i>hac113</i>	<i>nfe101</i>	<i>Xilon<sup>b</sup></i>
<i>chr114</i>	<i>hac114</i>	<i>Opie<sup>b</sup></i>	<i>Zeon<sup>b</sup></i>
<i>chr116</i>	<i>hac118</i>	<i>Prem-1<sup>b</sup></i>	
<i>Cin4<sup>b</sup></i>	<i>hag103</i>	<i>Prem-2<sup>b</sup></i>	
<i>Cinful<sup>b</sup></i>	<i>hag107</i>	<i>Reina<sup>b</sup></i>	
<i>Cinfil2<sup>b</sup></i>	<i>hda101</i>	<i>rubisco<sup>a</sup></i>	
<i>crd101</i>	<i>hda102</i>	<i>sdg101</i>	
<i>crd109</i>	<i>hda104</i>	<i>sdg102</i>	

Die Chromatingene, die putativ konstitutiv exprimierten Gene <sup>a</sup>, die Retrotransposons <sup>b</sup> und die Gene, die durch die d AG Geiger zur Verfügung gestellt wurden, <sup>c</sup> sind in alphabetischer Reihenfolge gegeben.

### 7.3 Differentielle Genexpression

Tabelle 20: Differentiell exprimierte Gene in Inzucht-Hybrid-Vergleichen

Gewebe	Genotypen-kombination	Übereinstimmungen in 4 Vergleichen	Übereinstimmungen in 3 Vergleichen
Embryo	UH005/UH301	JC1	AB5, AH1, CC0063, CD3, EC1, FE11, LG10, MC1, NG5
	UH250/UH301	AB5, cha116, UH5	CE8, DH12, gln4, RG5,
Endosperm			AA8, AB9, AC8, AF7, BC1, BD1, BH8, CC8, CC1002, CC1047, CC1067, CC0030, CC0385, CC0447, CC0005, CC0053, CC0006, CC0766, CC0829, CC0839, CC0842, CE8, Cin4, DC6, DD6, DG9, DH2, GC10, GD8, h2b5, IE3, IE6, IH2, JE6, JF4, KA4, KB4, KB8, KG11, KG5, KG9, MH10, NC2, NF10, NF5, NG3, NH3, OB10, OE3, OE8, QG4, RC6, set129, TC3, TF6, TH5, UB7, UE9
	UH005/UH301	AD9, CC0063, DD7, dwarf8, NFD105, QC5	AD9, CC1068, CC0368, CC0770, DD6, DH1, DH2, DH3, dwarf8, ED5, JC1, KG5, NF10, sdg105, TH5, UA5
	UH250/UH301	CC0194	

Übersicht über signifikant ( $P \leq 0,1$ ) differentiell exprimierte Gene, die in allen vier bzw. drei der vier Inzucht-Hybrid-Vergleiche in den unterschiedlichen Genotypkombinationen und Geweben detektiert wurden; Farblich gekennzeichnet sind embryospezifische Gene (grün), Endosperm-spezifische Gene (blau) und solche Gene (rot), die sowohl im Embryo als auch Endospermgewebe differentiell exprimiert sind.

Tabelle 21: Microarraydaten der in mehreren Inzucht-Hybrid-Vergleichen detektierten Gene

## A) Embryogewebe der interpool Genotypkombination UH301/UH005

Bezeichnung	005x005 vs 005x301 (-)	005x005 vs 301x005 (-)	005x301 vs 301x301 (-)	301x005 vs 301x301 (-)	005x301 vs 301x005 (-)	005x005 vs 301x301 (-)
AB5	-0,719 <sup>b</sup>	-0,553 <sup>b</sup>	-0,531 <sup>b</sup>	-0,697	0,166	-1,25 <sup>a</sup>
JC1	-0,717 <sup>a</sup>	-0,719 <sup>a</sup>	-0,446 <sup>a</sup>	-0,444 <sup>b</sup>	-0,002	-1,163 <sup>a</sup>
CC0063	0,444 <sup>b</sup>	0,391 <sup>b</sup>	0,392 <sup>b</sup>	0,446	-0,054	0,837 <sup>a</sup>

## B) Embryogewebe der intrapool Genotypkombination UH250/UH301

Bezeichnung	250x250 vs 250x301 (-)	250x250 vs 301x250 (-)	250x301 vs 301x301 (-)	301x250 vs 301x301 (-)	250x301 vs 301x250 (-)	250x250 vs 301x301 (-)
AB5	-1,434 <sup>a</sup>	-1,596 <sup>a</sup>	-0,759 <sup>a</sup>	-0,597 <sup>a</sup>	-0,162	-2,193 <sup>a</sup>

## C) Endospermgewebe der interpool Genotypkombination UH301/UH005

Bezeichnung	005x005 vs 005x301 (-)	005x005 vs 301x005 (-)	005x301 vs 301x301 (-)	301x005 vs 301x301 (-)	005x301 vs 301x005 (-)	005x005 vs 301x301 (-)
AD9	-0,343 <sup>a</sup>	-0,599 <sup>a</sup>	-0,549 <sup>a</sup>	-0,293 <sup>a</sup>	-0,255	-0,892 <sup>a</sup>
DD6	-1,08 <sup>a</sup>	-1,552 <sup>a</sup>	-0,801 <sup>a</sup>	-0,329	-0,4722	-1,881 <sup>a</sup>
DH2	-0,695 <sup>b</sup>	-1,104 <sup>a</sup>	-0,826 <sup>a</sup>	-0,418	-0,408	-1,521 <sup>a</sup>
KG5	-2,451 <sup>a</sup>	-3,101 <sup>a</sup>	-1,062 <sup>a</sup>	-0,412	-0,645	-3,513 <sup>a</sup>
NF10	-1,324 <sup>a</sup>	-1,45 <sup>a</sup>	-0,43 <sup>a</sup>	-0,305	-0,126	-1,755 <sup>a</sup>
CC0063	0,417 <sup>a</sup>	0,544 <sup>a</sup>	0,4478 <sup>a</sup>	0,321 <sup>a</sup>	0,127	0,865 <sup>a</sup>
TH5	-1,422 <sup>b</sup>	-2,477 <sup>a</sup>	-1,177 <sup>a</sup>	-0,122	-1,055	-2,598 <sup>a</sup>
<i>dwarf8</i>	-2,022 <sup>a</sup>	-1,695 <sup>a</sup>	2,002 <sup>a</sup>	1,675 <sup>a</sup>	0,328	-0,02

## D) Endosperm der intrapool Genotypkombination UH250/UH301

Bezeichnung	250x250 vs 250x301 (-)	250x250 vs 301x250 (-)	250x301 vs 301x301 (-)	301x250 vs 301x301 (-)	250x301 vs 301x250 (-)	250x250 vs 301x301 (-)
AD9	-0,716 <sup>a</sup>	-0,919 <sup>a</sup>	-0,587 <sup>a</sup>	-0,384	-0,203	-1,303 <sup>a</sup>
DD6	-0,59 <sup>a</sup>	-0,77 <sup>a</sup>	-0,56 <sup>b</sup>	-0,379	-0,181	-1,15 <sup>a</sup>
DH2	-0,412 <sup>b</sup>	-0,684 <sup>a</sup>	-0,702 <sup>a</sup>	-0,43	-0,272	-1,114 <sup>a</sup>
JC1	-0,645 <sup>a</sup>	-0,954 <sup>a</sup>	-0,43 <sup>a</sup>	-0,122	-0,309	-1,075 <sup>a</sup>
KG5	-1,943 <sup>a</sup>	-2,53 <sup>a</sup>	-1,289 <sup>b</sup>	-0,703	-0,587	-3,233 <sup>a</sup>
NF10	-0,65 <sup>a</sup>	-0,902 <sup>a</sup>	-0,512 <sup>a</sup>	-0,26	-0,252	-1,162 <sup>a</sup>
TH5	-2,323 <sup>a</sup>	-3,196 <sup>a</sup>	-1,456 <sup>a</sup>	-0,583	-0,873	-3,779 <sup>a</sup>
<i>dwarf8</i>	-1,268	-1,605 <sup>a</sup>	2,38 <sup>a</sup>	2,716 <sup>a</sup>	-0,336	1,112

Übersicht über die in den Inzucht-Hybrid-Vergleichen am häufigsten als differentiell exprimiert detektierten Gene, die eine signifikant differentielle Expression in beiden untersuchten Genotypkombinationen oder Geweben zeigen; Gegeben sind die Expressionsunterschiede, die bioinformatisch aus den Hybridisierungsdaten des Heterosis-3k-Array berechnet wurden. Negative Vorzeichen verweisen auf eine höhere Expression in dem jeweils mit (-) gekennzeichneten Genotyp, Werte zwischen 0 und 0,5 kennzeichnen eine schwach differentielle Expression, Werte zwischen 1,5 und 5 eine sehr stark differentielle Expression in den analysierten Genotypen.

<sup>a</sup> :  $P \leq 0,05$ , <sup>b</sup> :  $P \leq 0,1$

Tabelle 22: Differentielle Expression der Chromatingene in der interpool Genotypkombination

A)

Bezeichnung	005x005 vs 005x301 (-)	005x005 vs 301x005 (-)	005x301 vs 301x301 (-)	301x005 vs 301x301 (-)	005x301 vs 301x005 (-)	005x005 vs 301x301 (-)
<i>CHA120</i>		2,742 <sup>a</sup>				
<i>FIE1</i>		1,375 <sup>a</sup>				1,242 <sup>b</sup>
<i>GTB101</i>		2,028 <sup>a</sup>				
<i>HDA104</i>		1,228 <sup>a</sup>				0,971 <sup>b</sup>
<i>HDA117</i>		1,129 <sup>a</sup>				0,894 <sup>b</sup>
<i>HTA112</i>			0,518 <sup>a</sup>			0,675 <sup>a</sup>
Klon CC1104		0,611 <sup>b</sup>	0,579 <sup>b</sup>			1,003 <sup>a</sup>
Klon CH4	1,4556 <sup>c</sup>			1,41 <sup>c</sup>		1,782 <sup>a</sup>
Klon HC11		-0,627 <sup>c</sup>				-0,963 <sup>a</sup>
<i>SDG102</i>	0,934 <sup>c</sup>	1,51 <sup>a</sup>				0,902 <sup>c</sup>
<i>SDG130</i>		1,342 <sup>a</sup>	0,829 <sup>c</sup>			1,336 <sup>a</sup>
<i>SDG135</i>		1,453 <sup>a</sup>				
<i>SDG137</i>		1,362 <sup>a</sup>				0,938 <sup>b</sup>
<i>SET129</i>	0,898 <sup>a</sup>	0,998 <sup>a</sup>				0,921 <sup>a</sup>
<i>SMH106</i>		1,03 <sup>a</sup>				

B)

Bezeichnung	005x005 vs 005x301 (-)	005x005 vs 301x005 (-)	005x301 vs 301x301 (-)	301x005 vs 301x301(-)	005x301 vs 301x005 (-)	005x005 vs 301x301 (-)
<i>CENH3</i>	0,608 <sup>c</sup>	0,663 <sup>a</sup>	-0,485 <sup>c</sup>			
<i>CHA101.1</i>		0,718 <sup>a</sup>				0,618 <sup>b</sup>
<i>CHA126</i>		0,903 <sup>a</sup>				
<i>CHR101</i>		0,326 <sup>a</sup>				0,254 <sup>c</sup>
<i>FIE1</i>		0,684 <sup>a</sup>		-0,530 <sup>b</sup>		
<i>GTA101</i>		0,466 <sup>a</sup>	0,547 <sup>a</sup>			0,699 <sup>a</sup>
<i>GTC101</i>		1,78 <sup>a</sup>		-1,14 <sup>c</sup>	1,11 <sup>c</sup>	
<i>GTD101</i>		0,967 <sup>a</sup>		-1,083 <sup>a</sup>		
<i>GTE102</i>		0,592 <sup>a</sup>				
<i>HAC114</i>			-1,224 <sup>a</sup>	-1,04 <sup>b</sup>		-1,041 <sup>a</sup>
<i>HDA105</i>			0,583 <sup>a</sup>	0,373 <sup>b</sup>		0,488 <sup>a</sup>
<i>HDA113</i>		-0,76 <sup>a</sup>		0,569 <sup>a</sup>	-0,568 <sup>b</sup>	
<i>HDA117</i>		1,028 <sup>a</sup>		-0,886 <sup>b</sup>		
<i>HDT102</i>		0,314 <sup>a</sup>				0,37 <sup>a</sup>
<i>HTA112</i>	0,283 <sup>c</sup>	0,428 <sup>a</sup>				0,256 <sup>c</sup>
Klon CC1104		0,678 <sup>a</sup>	0,526 <sup>b</sup>			0,901 <sup>a</sup>
Klon CH4		0,576 <sup>a</sup>				
Klon NE8		1,431 <sup>a</sup>				
Klon UH7			0,788 <sup>a</sup>			0,993 <sup>a</sup>
<i>MBD116</i>		0,825 <sup>a</sup>		-0,742 <sup>b</sup>		
<i>NFC102</i>	0,178 <sup>c</sup>	0,185 <sup>a</sup>				
<i>NFD101</i>	0,143 <sup>c</sup>	0,311 <sup>a</sup>			0,1678 <sup>c</sup>	0,242 <sup>a</sup>
<i>NFD104</i>		0,168 <sup>a</sup>	-0,115 <sup>c</sup>	-0,19 <sup>a</sup>		
<i>NFD105</i>	0,184 <sup>b</sup>	0,142 <sup>b</sup>	-0,281 <sup>a</sup>	-0,239 <sup>a</sup>		
<i>OPIE</i>		0,792 <sup>a</sup>	-0,483 <sup>c</sup>	-0,856 <sup>a</sup>		
<i>SDG105</i>	0,233 <sup>b</sup>	0,406 <sup>a</sup>				0,282 <sup>a</sup>
<i>SET115</i>			-1,273 <sup>a</sup>	-1,5 <sup>a</sup>		-0,998 <sup>a</sup>
<i>SET124</i>			0,483 <sup>a</sup>	0,476 <sup>a</sup>		0,483 <sup>a</sup>
<i>SET129</i>		0,611 <sup>a</sup>	-0,559 <sup>b</sup>	-0,64 <sup>b</sup>		
<i>SMH104</i>			0,468 <sup>b</sup>			0,579 <sup>a</sup>

Übersicht über die differentiell exprimierte Chromatingene der interpool Genotypkombination UH301/UH005; Für A) Embryo- oder B) Endospermgewebe sind die signifikanten Expressionsunterschiede, die bei den Genotypvergleichen festgestellt wurden, gegeben. Negative Vorzeichen verweisen auf eine höhere Expression in dem jeweils mit (-) gekennzeichneten Genotyp, Werte zwischen 0 und 0,5 kennzeichnen eine schwach differentielle Expression, Werte zwischen 1,5 und 5 eine sehr stark differentielle Expression in den analysierten Genotypen. <sup>a</sup>:  $P \leq 0,05$ ; <sup>b</sup>:  $P \leq 0,1$ ; <sup>c</sup>:  $P \leq 0,15$

Tabelle 23: Differentielle Expression der Chromatingene in der intrapool Genotypkombination

A)

Bezeichnung	250x250 vs 250x301 (-)	250x250 vs 301x250 (-)	250x301 vs 301x301 (-)	301x250 vs 301x301 (-)	250x301 vs 301x250 (-)	250x250 vs 301x301 (-)
<i>FIE1</i>		0,773 <sup>a</sup>			0,815 <sup>b</sup>	
<i>HTA112</i>		0,516 <sup>a</sup>				
<i>SMH106</i>		0,577 <sup>b</sup>		-0,588 <sup>b</sup>	1,055 <sup>a</sup>	

B)

Bezeichnung	250x250 vs 250x301 (-)	250x250 vs 301x250 (-)	250x301 vs 301x301 (-)	301x250 vs 301x301(-)	250x301 vs 301x250 (-)	250x250 vs 301x301 (-)
<i>FIE1</i>						
<i>GTA101</i>	-0,686 <sup>b</sup>		0,641 <sup>a</sup>			
<i>GTC101</i>	1,225 <sup>a</sup>					1,713 <sup>a</sup>
<i>HTA112</i>		0,204 <sup>c</sup>	0,358 <sup>a</sup>			0,44 <sup>a</sup>
Klon UH7		0,344 <sup>c</sup>	0,384 <sup>c</sup>			0,518 <sup>a</sup>
<i>NFD104</i>		0,344 <sup>a</sup>				0,402 <sup>a</sup>
<i>NFD105</i>		0,253 <sup>c</sup>				0,392 <sup>a</sup>
<i>SDG105</i>	0,328 <sup>b</sup>	0,461 <sup>a</sup>	0,412 <sup>a</sup>			0,74 <sup>a</sup>
<i>SET124</i>	0,205 <sup>b</sup>	0,21 <sup>a</sup>				0,283 <sup>a</sup>

Übersicht über die differentiell exprimierte Chromatingene der intrapool Genotypkombination UH250/UH301, die auch in der interpool Genotypkombination UH301/UH005 als differentiell exprimiert detektiert wurden; Für A) Embryo- oder B) Endospermgewebe sind die signifikanten Expressionsunterschiede, die bei den Genotypvergleichen festgestellt wurden, gegeben. Negative Vorzeichen verweisen auf eine höhere Expression in dem jeweils mit (-) gekennzeichneten Genotyp, Werte zwischen 0 und 0,5 kennzeichnen eine schwach differentielle Expression, Werte zwischen 1,5 und 5 eine sehr stark differentielle Expression in den analysierten Genotypen. <sup>a</sup>:  $P \leq 0,05$ ; <sup>b</sup>:  $P \leq 0,1$ ; <sup>c</sup>:  $P \leq 0,15$

Tabelle 24: Differentielles Auftreten von transponierbaren Elementen und assoziierten Genen

**A)**

Bezeichnung	005x005 vs 005x301 (-)	005x005 vs 301x005 (-)	005x301 vs 301x301 (-)	301x005 vs 301x301 (-)	005x301 vs 301x005 (-)	005x005 vs 301x301 (-)
<i>CINFUL</i>		2,063 <sup>a</sup>				
<i>GYPHY</i>		1,334 <sup>b</sup>				1,74 <sup>a</sup>
Klon AH4 <sup>1</sup>						-0,726 <sup>a</sup>
Klon BC7		-1,251 <sup>c</sup>				-1,854 <sup>a</sup>
Klon CC8	-0,658 <sup>b</sup>	-0,543 <sup>b</sup>				-0,859 <sup>a</sup>
Klon GG6		-0,726 <sup>c</sup>	-1,265 <sup>a</sup>			-1,003 <sup>b</sup>
Klon RG10		-1,615 <sup>b</sup>	-1,344 <sup>c</sup>			-2,246 <sup>a</sup>
Klon TF6	-1,61 <sup>b</sup>	-1,332 <sup>b</sup>				-2,012 <sup>a</sup>
<i>REINA</i>		1,496 <sup>a</sup>				1,121 <sup>a</sup>

**B)**

Bezeichnung	005x005 vs 005x301 (-)	005x005 vs 301x005 (-)	005x301 vs 301x301 (-)	301x005 vs 301x301(-)	005x301 vs 301x005 (-)	005x005 vs 301x301 (-)
<i>CENTA</i>		1,301 <sup>a</sup>		-1,539 <sup>b</sup>	1,169 <sup>c</sup>	
<i>CIN4</i>		0,77 <sup>b</sup>	-0,973 <sup>a</sup>	-0,944 <sup>b</sup>		
Klon CC8	-0,54 <sup>b</sup>	-0,652 <sup>a</sup>	-0,42 <sup>b</sup>			-0,96 <sup>a</sup>
Klon OA11		-1,792 <sup>a</sup>	-1,653 <sup>a</sup>		-1,413 <sup>a</sup>	-2,032 <sup>a</sup>
Klon RG10		-1,591 <sup>a</sup>	-1,155 <sup>a</sup>			-1,977 <sup>a</sup>
Klon TF6	-1,063 <sup>a</sup>	-1,682 <sup>a</sup>	-0,844 <sup>a</sup>			-1,906 <sup>a</sup>
<i>OPIE</i>		0,792 <sup>a</sup>	-0,483 <sup>c</sup>	-0,856 <sup>a</sup>		
<i>PREM1</i>		0,435 <sup>a</sup>				
<i>PREM2</i>		1,332 <sup>a</sup>		-0,903 <sup>c</sup>		
<i>STONOR</i>		0,928 <sup>a</sup>				

Übersicht über die differentielle Expression von transponierbaren Elementen und assoziierten Genen in der interpool Genotypkombination UH301/UH005; Für A) Embryo- oder B) Endospermgewebe sind die signifikanten Expressionsunterschiede, die bei den Genotypvergleichen festgestellt wurden, gegeben. Negative Vorzeichen verweisen auf eine höhere Expression in dem jeweils mit (-) gekennzeichneten Genotyp, Werte zwischen 0 und 0,5 kennzeichnen eine schwach differentielle Expression, Werte zwischen 1,5 und 5 eine sehr stark differentielle Expression in den analysierten Genotypen. <sup>a</sup>:  $P \leq 0,05$ ; <sup>b</sup>:  $P \leq 0,1$ ; <sup>c</sup>:  $P \leq 0,15$ ,

<sup>1</sup> Datenbanknummer.: EE297712

## 8 Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Januar 2004 bis April 2007 in der Abteilung Entwicklungsbiologie und Biotechnologie am Biozentrum Klein Flottbek des Departments Biologie der Universität Hamburg angefertigt. Mein besonderer Dank gilt allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. Erhard Kranz möchte ich herzlich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, die in jeder Hinsicht gewährte Unterstützung bei der Isolierung der Embryo- und Endospermgewebe und die wissenschaftliche Begutachtung der Dissertation danken.

Für die Erstellung des zweiten Gutachtens danke ich Herrn Prof. Dr. Udo Wienand.

Bei Herrn Prof. Dr. Horst Lörz möchte ich mich für das gewährte Forschungsstipendium und sein stetes Interesse am Werdegang meiner Arbeit bedanken.

Besonders danken möchte ich Herr Dr. Stefan Scholten für die Bereitstellung des spannenden Themas, die sehr gute Betreuung und Zusammenarbeit und die vielen Denkanstöße und Diskussionen.

Allen Mitgliedern der Abteilung Entwicklungsbiologie und Biotechnologie und Ehemaligen danke ich für die Hilfsbereitschaft und freundliche Atmosphäre. Insbesondere gilt mein Dank Petra von Wiegen und Marlis Nissen für die unermüdliche Hilfe bei der Isolierung der Embryo- und Endospermgewebe und der Gewächshausarbeit sowie für die vielen Antworten auf meine Fragen und die interessanten Gespräche. Ein besonders lieber Dank geht ebenso an Sabina Miaskowska, die mich bei den Microarrayhybridisierungen, der genomische DNA-Isolierung und Plasmidpräparationen sehr unterstützt hat. Benjamin, Sofie, Arne, Andrea und Cornelius danke ich für die im Rahmen ihres Praktikums geleistete Hilfe. Bei Marlene Selle, Bärbel Hagemann, Heiko Luedke und Kerstin Kollek, aber auch bei vielen Ungenannten möchte ich mich für die technische Unterstützung im Gewächshaus und Laborbetrieb bedanken. Für die guten Tipps und wissenschaftlichen Anregungen danke ich Dr. Dirk Becker, Simone Amati, Sabine Grünberg, Sandra Kerbach, Petra Knies und Tobias Schenk. Bei Uschi Reinitz und Margarete Hunt möchte ich für die Verwaltungsgänge und netten Gespräche bedanken. An Dr. Maram Bader richte ich einen lieben Dank für vielerlei Hilfen und das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Schließlich möchte ich mich bei der Eiselen-Stiftung, Ulm, für das Promotionsstipendium bedanken.



---

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit versichere ich an Eides Statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe. Alle Stellen, die dem Wortlaut oder Sinn nach anderen Werken entnommen sind, habe ich in jedem Fall unter Angabe der Quelle deutlich als Entlehnung kenntlich gemacht.

Ferner versichere ich, dass ich diese Dissertation noch an keiner anderen Universität eingereicht habe, um ein Promotionsverfahren eröffnen zu lassen.

Hamburg, im April 2007

---